

## 富氢水缓解紫花苜蓿逆境胁迫:研究现状及应用探讨

崔为体，谢彦杰，沈文飚

(南京农业大学生命科学学院，江苏 南京 210095)

**摘要** 紫花苜蓿是种植范围最广的优质牧草之一，但其产量和质量正受到生产环境的制约。利用氢气的生物调节功能，通过富氢水处理能够调控紫花苜蓿包括抗氧化能力在内的细胞进程，进而缓解逆境胁迫。文章综述了氢气在植物中的生理效应，尤其是缓解逆境胁迫的研究进展，并对未来的研究及在牧草生产中的应用进行了展望。

**关键词** 紫花苜蓿；逆境胁迫；富氢水；氧化伤害

## Alleviated Environmental Stresses by Hydrogen-rich Water in Alfalfa: Research Situation and Possibility Application

CUI Wei-ti, XIE Yan-jie, SHEN Wen-biao

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Alfalfa is one of the high quality forage grasses in most range of growth. However, its production and quality are suffering of threats under the environment. Taking advantage of the biological regulatory of the hydrogen gas, the cell processes including anti-oxidative capacity were regulated by treating with hydrogen-rich water, which further resulted to the alleviation of environmental stresses. The physiological effects of hydrogen gas in plants, especially alleviation of the environmental stresses are reviewed in this paper. The prospects of research directions and further usage in forage grass production are forecast at the same time.

**Keywords:** Alfalfa; environmental stress; Hydrogen-rich water; Oxidative damage

紫花苜蓿是世界范围广泛种植的优质牧草，2011 年我国的种植面积就达 5662 万亩，产量约 2330 万吨。但是，2012 年我国仍进口苜蓿 44.22 万吨，比上年增加 60.46% (王加亭等, 2013, 中国畜牧业)。由于我国农业现代化过程中的普遍误区，草地畜牧业发展没有引起重视 (任继周, 2005, 草业科学)；苜蓿种植大多不占用农田耕地，有些甚至为贫瘠污染等问题土壤，因此给优质牧草生产带来难题。为满足日益增长的优质牧草需求，在目前种植现状下，如何提高种质资源、辅助促进苜蓿生长及增强抗性是未来的出路。另一方面，由于重金属等有毒物质可在食物链中富集，牧草生产在注重量的同时，不能忽略质的重要性。

### 1 植物应对逆境胁迫的机制及其调控

了解苜蓿逆境生理是提高种质及促进生产的基础。常见的逆境胁迫包括盐胁迫、干旱胁迫、温度胁迫、紫外辐射等。目前的研究表明，植物应对重金属胁迫的机制包括：阻止吸收、离子螯合及亚细胞区域化隔离、提高抗氧化系统、以及维持营养元素稳态等（Clemens et al., 2002, Trends Plant Sci.; Sharma and Dietz, 2009, Trends Plant Sci.）。多数的逆境胁迫都与氧化伤害有关，许多报道也证实缓解氧化伤害同时也能导致植物逆境胁迫耐性的增强。

而这些过程可以受到植物细胞中存在的一些信号分子如钙信号、一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)、硫化氢(H<sub>2</sub>S)等的调控。例如：一氧化氮能减少水稻叶片的镉毒性(Hse et al., 2004, Plant Growth Regul.)。一氧化碳信号通过提高抗氧化酶系统、谷胱甘肽和抗坏血酸等抗氧化剂缓解镉引起的氧化伤害(Han et al., 2008, New Phytol.)。硫化氢处理通过提高ATP酶、减少铝吸收和降低氧化伤害来缓解铝胁迫(Muhammad et al., 2012, J. Hazard. Mater.)。

### 2 氢气是一种新型植物生长调节剂

氢气(hydrogen gas, H<sub>2</sub>)是一种无色、无味、易燃的气态小分子，在水中溶解度很低。Shirahata等1997年就发现，具有高溶解H<sub>2</sub>的电解水有类似抗氧化物歧化酶(SOD-like)活性，能够清楚活性氧自由基以保护DNA免受损伤。最近氢气也被证明具有生物调节活性，有抗氧化、抗炎症、抗凋亡等作用(Huang et al., 2010, Free Radical Res.)。

早在上世纪中期就有高等植物内源性氢气产生的报道，但目前为止，其具体机制还不清楚。有关氢气促进种子萌发和植物生长很早就有报道，而针对其生理调节作用的研究近几年才逐渐引起人们的兴趣。通过把富氢水通入水中形成饱和的富氢气水(hydrogen-rich water, HRW)，人们发现其可以提高拟南芥、水稻、萝卜和白菜等植物对抗盐胁迫、镉胁迫和紫外线的能力(Xie et al., 2013, PLoS One; Xu et al., 2013, Plant Soil; Su et al., 2014, J. Agri. Food Chem.; Wu et al., 2015, J. Plant Physiol.)，并可能和植物激素存在互作(Zeng et al., 2013, PLoS One)。对比其他已知的气体信号分子，氢气已有许多条件符合信号分子的要求；至少有一点可以肯定的是，氢气具有调节生理的功能。

### 3 富氢水缓解紫花苜蓿逆境胁迫

#### 3.1 缓解百草枯引起的氧化胁迫

百草枯(paraquat, PQ)是广泛使用的除草剂之一，能迅速被植物绿色组织吸收使其枯死，对人毒性极大且无特效解毒药。百草枯对植物的伤害也包括根生长抑制和引起氧化胁迫，同时发现百草枯处理后紫花苜蓿内源氢气的含量增加。利用富氢水(hydrogen-rich water, HRW)处理模拟细胞内氢气的作用，发现HRW处理能缓解PQ引起的根生长抑制和脂质过氧化。进一步实验证实，富氢水处理调动了紫花苜蓿抗氧化系统，使得体内活性氧水平得到控制。供体和抑制剂处理结果表明，氢气的调控作用可能与血红素加氧酶/一氧化碳途径有关。另外，富氢水预处理还能缓解紫花苜蓿干旱、盐害和冷害胁迫(Jin et al., 2013, Plant Cell Environ.)。

### 3.2 缓解镉胁迫

通过 10%饱和度的富氢水预处理，显著减少镉 (cadmium, Cd) 引起的紫花苜蓿根部表征氧化伤害程度的丙二醛 (TBARS) 含量，明显缓解了镉引起的根长生长的抑制。进一步对抗氧化酶活性的测定发现，HRW 预处理提高了超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 的活性，并增强其基因表达，并最终减少根部镉引起的活性氧 (ROS) 过量产生。另外，HRW 预处理还提高了还原型谷胱甘肽的含量，缓解了镉引起的细胞氧化还原失衡，这可能是通过调控谷胱甘肽合成基因表达水平来实现的，因为 HRW 预处理显著提高了  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (ECS)、谷胱甘肽合成酶 (GS) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 的转录本。HRW 预处理还显著降低了紫花苜蓿根部的镉含量，但具体机制还不清楚。通过激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope) 观察显示，HRW 预处理明显降低了镉引起的根尖细胞 DNA 片段化，增强细胞活力；同样 DNA laddering 电泳分析也显示出相同结果。以上结果表明，HRW 预处理通过提高抗氧化能力、减少镉吸收和降低 DNA 损伤缓解了镉胁迫 (Cui et al., 2013, J. Hazard. Mater.)。

### 3.3 缓解汞胁迫

与镉相比，相同剂量的汞 (mercury, Hg) 能够引起植物更强的氧化伤害。10%饱和度的富氢水预处理 12 小时能明显缓解汞引起的氧化伤害和离子渗漏，使得紫花苜蓿汞毒害的表型得到明显缓解，根部汞含量也明显降低。HRW 预处理同样提高了紫花苜蓿根部 SOD、POD 和 APX 活性及基因表达，进而减少了活性氧产生，降低了膜脂过氧化和质膜透性。通过高效液相色谱测定发现，HRW 预处理增强了紫花苜蓿还原型同型谷胱甘肽 (homoglutathione) 和抗坏血酸含量，提高了细胞还原能力 (Cui et al., 2014, Ecotoxicol. Environ. Safe.)。

### 3.4 缓解铝胁迫

铝 (aluminum, Al) 也是一种重金属，微摩尔浓度的  $Al^{3+}$  就能对植物根的生长引起严重的抑制作用，并导致植物对矿质营养的吸收紊乱。一氧化氮是一种气体信号分子，已有许多研究表明其能够缓解铝毒引起的根生长抑制。通过富氢水预处理发现，50%饱和度的富氢水能够明显缓解铝对紫花苜蓿根生长的抑制，并明显减少根部的铝含量。利用一氧化氮的供体硝普钠 (SNP) 和清除剂 cPTIO 处理发现，HRW 对 Al 引起的根伸长能够被 SNP 模拟，并被 cPTIO 阻断，说明 HRW 缓解根生长的抑制可能是通过调控 NO 信号起作用。进一步通过激光共聚焦和电子磁选共振技术 (electron paramagnetic resonance) 发现，HRW 处理增强了铝毒害下的 NO 稳态，进而缓解了铝引起的紫花苜蓿根生长的抑制 (Chen et al., 2014, J. Hazard. Mater.)。

### 3.5 缓解铬胁迫

铬 (chromium, Cr) 作为一种重金属，引起植物的氧化伤害和生长的抑制。富氢水预处理同样调动了包括 SOD、POD 和 APX 在内的抗氧化酶系统，改善了铬引起的根部质膜透性和膜脂过氧化。另外，富氢水预处理也明显降低了紫花苜蓿对铬的吸收。

## 4 氢气的生理功能研究及富氢水在畜牧业中的应用前景展望

氢气可能是一种新型的气体信号分子，很长时间以来，人们认为他是不具备生理活性的惰性气体。

## 第六届中国苜蓿发展大会

---

但是，自从 2007 年自然医学杂志（Nature Medicine）Ohsawad 等的一篇文章报道氢气具有选择性抗氧化功能以后，对氢气生物效应的研究受到越来越多的关注。在动物及人类中都有许多研究报道氢气在肝脏、血液透析、糖尿病等临床中的抗氧化、抗肿瘤、抗感染和抗凋亡等作用（Zheng et al., 2011, Clin. Exp. Pharm. Acol. P.），但是其具体的作用机理还不清楚。关于动物体内氢气产生的来源，目前还没有找到直接产生氢气的酶；但有趣的是，动物体一直以来都在受到氢气调控的益处，因为动物肠道的微生物可以产生氢气（Kajiya et al., 2009, Biochem. Biophys. Res. Commun.）。另外，利用人、小鼠等模型动物的研究表明，动物饮用富氢水可以缓解多种病症并提高免疫力。

在植物中，关于氢气生理调节功能的研究才刚刚开始，文章报道多针对于其在抵抗非生物胁迫中的作用。目前植物中氢气的研究还处于表型及初步的生理生化阶段，我们对其作用的分子机制还知之甚少。未来的研究，关于氢气内源产生途径、作用方式和靶位点等方面的研究将会是研究的热点和方向。另外，虽然有报道氢气可以通过一氧化氮、一氧化碳信号系统起作用，对其他细胞通路或激素如生长素、脱落酸、乙烯等的互作也是值得探查的。

虽然已经有氢气作为植物生长调节剂的相关专利，但是还未见其大规模应用及转化。氢气在农业上的应用还需很长的路要走。第一：关于大量富氢水的制备方法，目前氢气的制备多用电解水的方法，市面上有多种仪器供选择，但是要制备大量的富氢水，时间和操作上还存在制约因素；第二：关于制备的安全性，虽然氢气溶解度很小，富氢水的安全性也没问题，但是氢气是易燃易爆气体，在制备富氢水时会有大量气体逃逸，还需注意在比较通风的环境进行；第三：关于富氢水的使用，目前的试验结果显示，氢气生物学效应类似于信号分子，具有广谱性的特点，这并不象一些农药或化肥能专一解决某种农业生产问题。但是，也许在多种环境问题的综合解决上，氢气具有一些优势。尤其是氢气自身拥有绿色、无污染等优点，其生产应用也具有良好的前景。解决以上这些问题，需要一些公司和个人能开发出一些新型产品，来提高富氢水的效果同时解决存在的问题。科技的发展日新月异，相信不久的将来能有基于氢气研究的产品或理论能惠及农业生产，为现代农业助力腾飞。