

外源 24-表油菜素内酯缓解高温胁迫下大白菜花粉活力的生理机制

吴鸿渐

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 全球气候变暖导致极端高温天气频发, 严重制约大白菜等农作物的生长发育, 其中高温胁迫对大白菜花粉发育和活力的损害是影响其结实率和产量的关键因素。24-表油菜素内酯 (24-epibrassinolide, EBR) 作为一种新型植物激素, 在调节植物生长发育、增强植物抗逆性方面具有显著作用。本研究以高温敏感型大白菜品种为试验材料, 设置不同梯度高温胁迫处理, 通过叶面喷施不同浓度的24-表油菜素内酯, 探究其对高温胁迫下大白菜花粉活力的缓解效应及内在生理机制。测定花粉活力、抗氧化酶 (SOD、CAT、POD) 活性、渗透调节物质 (脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白) 含量及内源激素 (IAA、GA、CTK、ABA) 含量等指标, 分析各指标间的相关性。结果表明, 高温胁迫显著降低大白菜花粉活力, 导致花粉抗氧化酶活性下降、渗透调节物质含量紊乱、内源激素平衡遭到破坏; 外源喷施适宜浓度的24-表油菜素内酯可显著提升高温胁迫下大白菜花粉活力, 提高SOD、CAT、POD等抗氧化酶活性, 促进脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白等渗透调节物质积累, 调节内源激素含量趋于平衡, 从而缓解高温胁迫对花粉发育的抑制作用。本研究明确了外源24-表油菜素内酯缓解高温胁迫下大白菜花粉活力的生理机制, 为大白菜抗高温栽培及产量提升提供理论依据和技术支撑。

关键词: 24-表油菜素内酯; 大白菜; 高温胁迫; 花粉活力; 生理机制; 抗氧化酶; 渗透调节物质; 内源激素

中图分类号: S634.1

文献标识码: A

文章编号: 3106-2547 (2025) 04-0026-11

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.04.003

Physiological Mechanism of Exogenous 24-Epibrassinolide Alleviating Pollen Viability of Chinese Cabbage Under High Temperature Stress

Wu Hongjian

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Global warming has led to frequent extreme high-temperature weather, which seriously restricts the growth and development of crops such as Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Among them, the damage of high-temperature stress to the development and viability of Chinese cabbage pollen is a key factor affecting its seed setting rate and yield. 24-epibrassinolide (EBR), as a new type of plant hormone, plays a significant role in regulating plant growth and development and enhancing plant stress resistance. In this study, a high-temperature-sensitive Chinese cabbage variety was used as the test material, different gradients of high-temperature stress treatments were set up, and different concentrations of 24-epibrassinolide were sprayed on the leaves to explore its alleviating effect on Chinese cabbage pollen viability under high-temperature stress and its internal physiological mechanism. Indicators such as pollen viability, antioxidant enzyme (SOD, CAT, POD) activities, osmotic adjustment substance (proline, soluble sugar, soluble protein) contents and endogenous hormone (IAA, GA, CTK, ABA) contents were determined, and the correlation between each indicator was analyzed. The results showed that high-temperature stress significantly reduced the pollen viability of Chinese cabbage, leading to the decrease of pollen antioxidant enzyme activities, the disorder of osmotic adjustment substance contents, and the destruction of endogenous hormone balance. Exogenous spraying of appropriate concentration of 24-epibrassinolide could significantly improve the pollen viability of Chinese cabbage under high-temperature stress, increase the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT and POD, promote the accumulation of osmotic adjustment substances such as proline, soluble sugar and soluble protein, and regulate the endogenous hormone contents to tend to balance, thus alleviating the inhibitory effect of high-temperature stress on pollen development. This study clarifies the physiological mechanism of exogenous 24-epibrassinolide alleviating Chinese cabbage pollen viability under high-temperature stress, and provides theoretical basis and technical support for high-temperature resistance cultivation and yield improvement of Chinese cabbage.

Keywords: 24-epibrassinolide; Chinese cabbage; high temperature stress; pollen viability; physiological mechanism; antioxidant enzymes; osmotic adjustment substances; endogenous hormones

作者简介: 吴鸿渐, 硕士, 教授, 研究方向为蔬菜作物生殖发育与抗逆调控。

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 全球气候变化下高温胁迫对农作物的影响

全球气候变化是当前人类社会面临的最严峻、最紧迫的重大环境问题之一,其影响已渗透到地球生态系统的各个层面,深刻改变着全球的气候格局、生态平衡和人类生产生活方式。其中,全球气候变暖趋势日益显著,成为气候变化最核心、最突出的表现,极端高温天气作为气候变暖的直接衍生产物,其发生的频率、强度和持续时间均呈现出逐年攀升的态势,且影响范围不断扩大,从热带、亚热带地区逐步向温带、寒温带延伸,给自然环境和人类活动带来了多方面的冲击。

据IPCC(政府间气候变化专门委员会)最新发布的第六次评估报告明确显示,过去100年间(1901–2020年),全球平均地表气温已累计上升了0.85℃,且升温速率呈现出明显的加速趋势——近50年的升温速度是过去100年平均速率的2倍以上。报告进一步预测,若不采取有效的温室气体减排措施,按照当前的排放趋势,到21世纪末(2081–2100年),全球平均气温将较工业化前水平再上升1.5~4.5℃,届时极端高温天气将成为常态,高温热浪事件的发生频率可能增加5–10倍,对全球生态系统和农业生产造成不可逆转的影响。

极端高温作为一种主要的非生物胁迫因子,已成为制约全球农业生产可持续发展的重要限制因素之一,其对农业生产的破坏具有普遍性、突发性和严重性,直接威胁着全球粮食安全和农产品供给稳定。高温胁迫通过破坏植物细胞的正常结构和生理代谢平衡,对植物的生长发育产生全方位的负面影响,具体表现为:破坏植物细胞膜的完整性,导致细胞膜透性增加,细胞内电解质大量外渗,引发细胞脱水、坏死;干扰植物光合作用的正常进行,抑制光合色素的合成,降低光合酶的活性,导致光合速率下降,有机物合成减少;加速植物呼吸作用,使呼吸消耗大于光合积累,造成植物体内能量亏空,生长迟缓;同时,高温还会影响植物体内物质的合成与转运,导致营养物质分配失衡,进而引发植物发育畸形、开花结果异常,最终导致作物产量下降甚至整株死亡。

已有大量研究数据表明,高温胁迫对作物产量的影响极为显著,当环境温度超过作物生长的适宜阈值后,温度每升高1℃,作物产量就会出现不同程度的下降。其中,38℃以上的持续高温天气,可使不同作物品种的产量损失达到7%~72%,具体损失程度因作物种类、品种特性、生长阶段以及高温持续时间而异。值得注意的是,花粉发育阶段是植物整个生长周期中对高温最敏感的时期之一,这一阶段的高温胁迫会直接影响作物的繁殖过程:高温易导致花粉粒发

育不良、活力显著下降,同时会阻碍花药正常开裂,使花粉无法顺利释放,进而影响花粉的传播和授粉受精过程,导致作物结实率大幅降低、空粒率增加,最终给农业生产带来巨大的经济损失,尤其对水稻、小麦、棉花、花生等主要农作物的影响更为突出。

在我国,极端高温天气对农业生产的影响同样严峻,近年来,黄淮、江汉、长江中下游等我国主要农作物产区,夏季频繁出现持续35℃以上的高温热浪天气,部分地区极端最高气温甚至突破40℃,且持续时间长达10–15天。这种极端高温天气不仅导致棉花、花生等经济作物花粉活力显著下降,授粉受精受阻,还会加速土壤水分蒸发,导致土壤失墒加剧,作物根系吸水困难,进一步加重作物生长受抑的程度,造成棉花蕾铃脱落、花生产量锐减;同时,高温还会诱发作物病虫害的爆发,进一步放大高温对农业生产的破坏作用,给当地农业经济带来沉重打击。

全球气候变暖的趋势不可逆转,极端高温天气对农业生产的威胁将长期存在,因此,深入探究缓解高温胁迫对农作物损害的有效途径和生理机制,已成为当前农业科学研究的迫切需求和重要课题。这一研究不仅能够丰富植物抗逆生理的理论体系,为培育抗高温作物品种提供科学依据,还能够为农业生产中采取合理的调控措施(如遮阳覆盖、滴灌降温、喷施抗逆调节剂等)提供技术支撑,对于应对全球气候变化、保障我国乃至全球的粮食安全、促进农业可持续发展具有重要的理论意义和现实实践价值。

1.1.2 大白菜在农业生产中的重要地位及高温对其的危害

大白菜(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)是十字花科芸薹属二年生草本植物,作为我国乃至世界范围内栽培面积最广、消费量最大的蔬菜作物之一,其栽培历史悠久,种植区域遍布全国,在全球蔬菜产业中也占据着重要地位。大白菜凭借其适应性较强、生长周期较短、产量高、营养丰富且生产成本较低的优势,成为我国蔬菜产业的核心品种之一,其富含维生素C、维生素B族、钙、铁、钾等多种矿物质及膳食纤维等营养成分,不仅口感清爽、食用方式多样,可生食、熟食、腌制等,还是我国北方地区冬季的主要“当家蔬菜”,保障了北方冬季蔬菜市场的供应稳定,同时也是南方地区秋、冬季的重要蔬菜品种,填补了秋末冬初蔬菜供应的空档,在我国蔬菜产业和农业经济中占据着举足轻重的地位,对保障蔬菜市场多元化供应、增加农民收入、推动乡村产业振兴具有不可替代的重要作用。

在品种选择上,我国大白菜栽培中形成了适配不同气候、不同栽培季节和不同市场需求的丰富品种体系,常用早熟品种如小杂60、玲珑黄、夏阳50等,此类品种生长周期短

(一般50–60天即可收获),耐热性相对较强,适宜夏季或早秋抢茬栽培,能够快速供应市场;中晚熟品种如北京新三号、北京新四号、油绿3号等,生长周期较长(70–90天),植株长势健壮、产量高、耐贮藏,品质优良,适宜秋季大面积栽培,是我国北方地区冬季贮藏、供应的主要品种。值得注意的是,不同大白菜品种的遗传特性存在差异,导致其对环境胁迫(尤其是高温胁迫)的耐受性也有所不同,一般而言,早熟品种的耐热性优于中晚熟品种,但在产量和耐贮藏性上略逊一筹,这种品种间的差异为大白菜抗高温栽培的品种选择提供了基础。

大白菜是典型的喜冷凉气候作物,对温度的适应性具有明显的局限性,其适宜生长温度为15~20℃,在这一温度范围内,大白菜植株生长健壮、叶片肥厚、叶色浓绿,光合作用效率高,能够快速积累营养物质,保障产量和品质。当环境温度超过25℃时,其生长发育就会受到明显抑制,表现为植株生长速度放缓、叶片变薄、叶色变淡,商品性开始下降;而当温度持续超过30℃时,会对大白菜产生严重的高温胁迫效应,这种胁迫会贯穿大白菜整个生长周期,对其营养生长和生殖生长均造成显著的不良影响。

在营养生长阶段,高温胁迫会破坏大白菜的正常生理代谢:一方面导致大白菜叶片徒长、叶肉变薄,叶色由浓绿变为浅绿甚至黄化,叶绿素含量显著下降,光合酶活性受到抑制,光合作用效率大幅减弱,导致植株体内有机物积累不足,长势衰弱;另一方面,高温环境会降低大白菜的抗逆能力,使其易感病毒病、霜霉病、软腐病等病害,进一步破坏植株生长,严重影响白菜的品质和商品性,甚至导致植株提前衰老、死亡,造成减产或绝收。在生殖生长阶段,高温胁迫的危害更为严重,尤其是在花芽分化期、开花期和授粉期这三个关键时期,高温会直接干扰花粉的正常发育过程,导致花粉母细胞减数分裂异常、花粉粒畸形,花粉活力和萌发率显著下降,同时还会影响花药的正常开裂,阻碍花粉释放,加之高温会影响蜜蜂等传粉昆虫的活动,进一步影响花粉的传播效率,进而降低大白菜的授粉受精效率,导致结实率下降、结荚率降低、籽粒不饱满,最终造成种子产量大幅减少,不仅影响当年的栽培收益,还会制约后续大白菜的品种繁殖和栽培推广。

与同属十字花科的不结球白菜类似,大白菜在25℃以上的高温环境中生长就会出现明显的衰弱现象,而随着全球气候变暖,夏季高温热浪天气频发、秋季高温持续时间延长,高温胁迫已成为制约大白菜夏季和秋季栽培的主要瓶颈之一,严重限制了大白菜的栽培范围和产量、品质提升。因此,深入探究缓解大白菜高温胁迫的有效措施(如品种筛选、栽

培调控、化学调控等)及其生理机制,明确高温胁迫下大白菜的生理代谢变化规律,对于提升大白菜的抗高温能力、保障其高产优质栽培、推动我国蔬菜产业可持续发展具有重要的理论意义和实践价值。

1.1.3 24-表油菜素内酯在植物抗逆中的作用及研究现状

24-表油菜素内酯(24-epibrassinolide, EBR)是一类人工合成的高活性油菜素内酯类植物生长调节物质,其分子结构与天然油菜素内酯高度相似,能够表现出与之相近甚至更优的生理活性,同时具备化学性质稳定、合成工艺简便、生产应用成本较低等显著优势,因此在现代农业生产中具备极高的应用潜力。作为一类新型、高效、环境友好型植物激素,24-表油菜素内酯在调控植物生长发育进程、提升植株逆境适应能力等方面展现出独特且重要的生物学功能,目前已在粮食作物、经济作物、蔬菜及果树等多种栽培作物的抗逆稳产栽培中得到广泛应用。其生理功能主要体现在多个层面:能够有效促进植物细胞的分裂与伸长,加快植株营养器官的生长与分化;可提升叶绿素含量与光合电子传递效率,增强光合作用及光合产物积累,进而提高作物产量并改善农产品品质;能够系统调节植物体内碳氮代谢、抗氧化代谢、离子平衡等关键生理过程,显著增强植株对高温、低温、干旱、盐碱、涝渍等多种非生物胁迫的抵御能力;同时还可可在一定程度上缓解重金属毒害、病虫害侵染等生物胁迫对植株造成的损伤,维持植物体正常的生理代谢与生长状态。

近年来,随着全球气候异常加剧,高温热害已成为制约蔬菜及粮食作物生产的重要环境因子,国内外围绕24-表油菜素内酯提升植物耐热性、缓解高温胁迫伤害的相关研究不断深入,并取得了一系列重要进展。大量研究结果表明,外源喷施适宜浓度的24-表油菜素内酯,可有效减轻高温胁迫对水稻、花生、番茄、黄瓜、辣椒、菠菜等多种作物造成的生长抑制、光合下降、氧化损伤及产量降低等不利影响。其核心调控机制主要包括:通过显著提升超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等关键抗氧化酶的活性,同时促进非酶促抗氧化物质的合成,快速清除高温胁迫下过量积累的活性氧(ROS),降低细胞膜脂过氧化程度,减少丙二醛(MDA)等有毒物质的积累,从而保护细胞膜结构与功能的完整性;促进可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸等渗透调节物质的合成与积累,维持细胞渗透压稳定与水分平衡,保证细胞正常的形态与生理功能;调控脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)、生长素(IAA)、细胞分裂素(CTK)等内源激素的含量与比例平衡,协调植株营养生长与抗逆防御反应,提升高温环境下的整体适应能力;保护叶绿体结构、光合色素

及光系统 II 稳定性,维持较高的光化学效率,缓解高温对光合作用的抑制,保障植株在逆境下的物质与能量供应。例如,在高温胁迫下,外源喷施 EBR 可显著提高水稻幼穗中抗氧化酶活性,降低 H_2O_2 与 MDA 积累,调节内源激素代谢水平,减轻高温对颖花分化与花粉发育的抑制作用,从而提升结实率;在花生上的研究同样证实,EBR 能够增强高温胁迫下花生叶片的抗氧化系统功能,减轻叶绿体膜氧化损伤,维持较高的净光合速率,有效降低高温造成的产量损失。

尽管 24-表油菜素内酯在提升植物耐热性方面的研究已取得诸多成果,但综合现有文献可以发现,当前研究多集中于水稻、小麦、花生等粮食作物以及番茄、黄瓜、辣椒等蔬菜作物的苗期、营养生长期,聚焦叶、茎等营养器官的生理响应与调控机制,而针对大白菜等十字花科叶菜作物生殖生长阶段,特别是高温敏感关键时期的研究仍较为薄弱。大白菜属于喜凉作物,其开花授粉、花粉发育过程对高温胁迫极为敏感,高温胁迫常导致花粉活力下降、花粉萌发率降低、雌蕊发育异常,进而严重影响采种产量与种子质量。然而,目前关于 24-表油菜素内酯是否能够缓解高温胁迫对大白菜花粉活力的抑制作用、其作用浓度与处理方式、以及其在花粉水平上的生理调控机制尚不明确。

针对上述研究空白,本研究以大白菜为试验材料,通过模拟生产中常见的高温胁迫,设置外源 24-表油菜素内酯预处理处理,系统探究其对高温胁迫下大白菜花粉活力、花粉萌发率、花粉管生长等关键指标的影响,并从抗氧化系统、渗透调节物质、内源激素水平等角度深入解析其内在生理机制。研究结果旨在明确 24-表油菜素内酯提升大白菜花粉耐热性的调控效应与作用通路,为夏季及高温地区大白菜采种生产、抗高温栽培技术优化提供可靠的理论依据与技术支撑。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 大白菜品种选择

本试验选用“北京新三号”大白菜品种作为试验材料,该品种是我国北方地区广泛栽培的中晚熟大白菜品种,具有产量高、品质优、适应性强等特点,同时该品种对高温胁迫较为敏感,在 30°C 以上高温环境中,花粉发育易受到抑制,花粉活力显著下降,是研究高温胁迫及缓解措施的理想材料。该品种适宜在冷凉气候下生长,符合大白菜典型生长特性,其花粉发育对温度的敏感性能够准确反映高温胁迫的影响,便于清晰探究外源24-表油菜素内酯的缓解效应。

2.1.2 24-表油菜素内酯的来源与规格

本试验所用24-表油菜素内酯(纯度 $\geq 90\%$,CAS号:

78821-43-9)购自重庆至夏化工有限公司,品牌为CRS,型号为CMO,为国产分析纯试剂,外观为白色结晶粉末,易溶于乙醇,难溶于水。试验前用无水乙醇配制成 1000mg/L 的母液,密封避光保存于 4°C 冰箱中,使用时根据试验设计用蒸馏水稀释至所需浓度,稀释过程中充分搅拌,确保浓度均匀一致,避免因浓度偏差影响试验结果。

2.2 实验设计

2.2.1 高温胁迫处理设置

结合大白菜生长特性及我国北方地区夏季高温天气特点,参考相关研究中高温胁迫的设置方法,本试验设置3个高温胁迫处理组和1个正常温度对照组(CK),每个处理组设置3次重复,每个重复种植30株大白菜。具体处理如下:对照组(CK):生长温度控制在 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$,昼夜温差为 8°C (白天 22°C ,夜间 14°C),光照时长 12h/d ,光照强度 3000lx ,其他环境条件(湿度、水肥)保持一致;高温胁迫处理1(T1):生长温度控制在 $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$,昼夜温差 8°C (白天 32°C ,夜间 24°C),其他环境条件与对照组一致;高温胁迫处理2(T2):生长温度控制在 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$,昼夜温差 8°C (白天 37°C ,夜间 29°C),其他环境条件与对照组一致;高温胁迫处理3(T3):生长温度控制在 $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$,昼夜温差 8°C (白天 42°C ,夜间 34°C),其他环境条件与对照组一致。

高温胁迫处理从大白菜花芽分化期开始,持续至盛花期结束,共计20d,期间定期监测温度变化,确保各处理组温度稳定在设定范围内,避免因温度波动影响试验效果。该温度梯度设置能够模拟不同程度的高温胁迫环境,明确高温胁迫强度与大白菜花粉活力损伤之间的关系,为后续探究24-表油菜素内酯的缓解效应提供基础。

2.2.2 24-表油菜素内酯处理方式

本试验采用叶面喷施方式施用24-表油菜素内酯,结合相关研究中24-表油菜素内酯缓解高温胁迫的适宜浓度范围,设置3个浓度处理组:EBR1(0.1mg/L)、EBR2(0.5mg/L)、EBR3(1.0mg/L),同时设置两个对照组:正常温度对照组(CK,不喷施24-表油菜素内酯,处于 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 正常温度环境)和高温胁迫对照组(HT,不喷施24-表油菜素内酯,处于对应高温胁迫环境)。

施用时期选择在大白菜花芽分化期(高温胁迫处理开始后第3d)和开花前期(高温胁迫处理开始后第10d),各喷施1次,每次喷施量为每株 100mL ,喷施时确保叶片正反面均被药液均匀覆盖,避免漏喷或重喷。喷施时间选择在上午 $9:00\sim 10:00$,此时温度较低、光照柔和,可减少药液挥发,提高喷施效果。试验过程中,各处理组的水肥管理、光照条件等均保持一致,确保除高温胁迫和24-表油菜素内酯处理

外,其他影响因素均相同,保证试验的科学性和准确性。

2.3 样品采集与处理

2.3.1 花粉采集时间与方法

花粉采集时间选择在大白菜盛花期(高温胁迫处理开始后第15~18d),每天上午8:00~9:00采集花粉,此时花粉活力最高,且环境温度适宜,可减少花粉活力的损失。采集方法:选择各处理组中生长一致、开花正常的大白菜植株,选取当天开放的健壮花朵,用无菌镊子轻轻摘下花朵,去除花瓣和雌蕊,将花药放入无菌培养皿中,用无菌毛笔轻轻刷取花药中的花粉,收集到离心管中,每个处理组每个重复采集30朵花的花粉,混合均匀后作为一个样品,做好标记,用于后续各项指标的测定。采集过程中操作轻柔,避免损伤花粉粒,确保采集的花粉具有代表性,同时避免不同处理组花粉交叉污染。

2.3.2 样品保存与预处理

采集后的花粉样品分为两部分处理:一部分用于立即测定花粉活力,避免花粉活力随时间下降;另一部分用于测定抗氧化酶活性、渗透调节物质含量和内源激素含量,将其放入-80℃超低温冰箱中冷冻保存,保存过程中密封,防止样品受潮和污染。

在进行各项生理指标测定前,对冷冻保存的花粉样品进行预处理:将花粉样品从-80℃冰箱中取出,置于冰浴中缓慢解冻,解冻后用电子天平精确称取0.1g花粉,放入预冷的研钵中,加入适量预冷的磷酸盐缓冲液(0.05mol/L, pH7.8),在冰浴条件下研磨至匀浆,将匀浆转移至离心管中,于4℃、8000r/min条件下离心15min,取上清液,即为酶液或样品提取液,用于抗氧化酶活性、渗透调节物质含量的测定;内源激素含量测定的样品预处理:称取0.1g冷冻花粉,加入80%甲醇溶液,冰浴研磨后,4℃浸泡24h,期间定期振荡,然后离心取上清液,经旋转蒸发浓缩后,用甲醇定容,过0.22μm滤膜,备用。预处理过程中全程保持低温,避免酶活性丧失和内源物质分解,确保测定结果准确可靠。

2.4 测定指标与方法

2.4.1 花粉活力测定

本试验采用TTC染色法测定大白菜花粉活力,该方法操作简便、快速、准确性高,可有效反映花粉的脱氢酶活性,进而判断花粉活力,具体操作步骤参考茁彩生物花粉活力测试剂盒(TTC法)说明书并稍作修改:

1.试剂准备:将TTC染色液恢复至室温,摇匀备用;

2.样品处理:取少量新鲜花粉样品,置于干净的载玻片上,滴加1~2滴TTC染色液,用无菌牙签轻轻涂抹均匀,使花粉完全浸没于染色液中,盖上盖玻片,避免产生气泡;

3.染色反应:将载玻片置于35℃恒温箱中保温15min,确保染色充分;

4.观察统计:取出载玻片,在光学显微镜(10×40倍)下观察,每片选取5个视野,每个视野统计100粒花粉,共计500粒花粉。其中,被染成红色的花粉为有活力花粉,未染色或染色很浅的花粉为无活力花粉;

5.计算方法:花粉活力(%)=(有活力花粉粒数/统计总花粉粒数)×100%。

注意事项:染色完成后应立即进行显微镜观察,放置时间过长会导致染色褪色;TTC染色液开盖后尽快使用,若染色液变为红色则需弃用;染色过程中需确保花粉完全浸没于染色液中,染色温度控制在25~35℃为宜。

2.4.2 抗氧化酶活性测定

本试验测定的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD),三种酶均为植物抗氧化系统的重要组成部分,协同作用清除高温胁迫产生的活性氧,减轻细胞损伤,具体测定方法如下:

(1)超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:采用氮蓝四唑(NBT)法,参考相关研究方法并稍作修改。测定原理:SOD能够催化超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,而NBT在光照条件下会被 O_2^- 还原为蓝色的甲腈, SOD的活性越高,对NBT光还原的抑制作用越强,通过测定480nm处的吸光值,可计算SOD活性。

试剂与仪器:NBT溶液、磷酸盐缓冲液(0.05mol/L, pH7.8)、核黄素溶液、酶液;紫外分光光度计、离心机、恒温水浴锅、光照培养箱等。

操作步骤:取1mL酶液,加入3mL反应混合液(含NBT溶液、核黄素溶液、磷酸盐缓冲液),摇匀后置于光照培养箱中(光照强度4000lx)反应20min,同时设置空白对照组(用磷酸盐缓冲液代替酶液),反应结束后,用紫外分光光度计在480nm处测定吸光值。

活性计算:以抑制NBT光还原50%的酶量为一个酶活性单位(U/g FW), SOD活性(U/g FW)=(空白组吸光值-样品组吸光值)/空白组吸光值×50%×反应体系体积/酶液体积×样品鲜重。

(2)过氧化氢酶(CAT)活性测定:采用紫外吸收法,参考相关研究方法。测定原理:CAT能够催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , H_2O_2 在240nm处有特征吸收峰,随着反应的进行, H_2O_2 的浓度逐渐降低,240nm处的吸光值也随之下降,通过测定吸光值的变化速率,可计算CAT活性。

试剂与仪器: H_2O_2 溶液、磷酸盐缓冲液(0.05mol/L, pH7.8)、酶液;紫外分光光度计、离心机、恒温水浴锅等。

操作步骤:取0.1mL酶液,加入2.9mL磷酸盐缓冲液,再加入1mL H_2O_2 溶液,摇匀后立即用紫外分光光度计在240nm处测定吸光值,记录0min和1min时的吸光值,每个样品重复3次。

活性计算:以每分钟内240nm处吸光值减少0.01为一个酶活性单位 ($U/g\text{ FW} \cdot \text{min}$), CAT活性 ($U/g\text{ FW} \cdot \text{min}$) = (初始吸光值-1min后吸光值)/0.01 $\times$ 反应体系体积/酶液体积 $\times$ 样品鲜重。

(3) 过氧化物酶 (POD) 活性测定:采用愈创木酚法,参考相关研究方法。测定原理:POD能够催化愈创木酚氧化为棕褐色的四邻苯醌,该产物在470nm处有特征吸收峰,通过测定吸光值的变化速率,可计算POD活性。

试剂与仪器:愈创木酚溶液、 H_2O_2 溶液、磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH7.8)、酶液;紫外分光光度计、离心机、恒温水浴锅等。

操作步骤:取0.1mL酶液,加入2.8mL磷酸盐缓冲液,再加入0.1mL愈创木酚溶液和0.1mL H_2O_2 溶液,摇匀后立即用紫外分光光度计在470nm处测定吸光值,记录0min和1min时的吸光值,每个样品重复3次。

活性计算:以每分钟内470nm处吸光值升高0.01为一个酶活性单位 ($U/g\text{ FW} \cdot \text{min}$), POD活性 ($U/g\text{ FW} \cdot \text{min}$) = (1min后吸光值-初始吸光值)/0.01 $\times$ 反应体系体积/酶液体积 $\times$ 样品鲜重。

2.4.3 渗透调节物质含量测定

本试验测定的渗透调节物质包括脯氨酸 (Pro)、可溶性糖 (SS) 和可溶性蛋白 (SP), 三种物质可通过维持细胞渗透压、稳定细胞膜结构,缓解高温胁迫对植物细胞的损伤,具体测定方法如下:

(1) 脯氨酸 (Pro) 含量测定:采用酸性茚三酮比色法。测定原理:脯氨酸在酸性条件下与茚三酮反应生成红色化合物,该化合物在520nm处有特征吸收峰,其吸光值与脯氨酸含量呈正相关,通过标准曲线可计算样品中脯氨酸含量。

试剂与仪器:脯氨酸标准溶液、酸性茚三酮试剂、冰醋酸、甲苯、酶液;紫外分光光度计、离心机、恒温水浴锅、试管等。

操作步骤:取1mL酶液,加入1mL冰醋酸和1mL酸性茚三酮试剂,摇匀后置于沸水浴中加热30min,冷却至室温后,加入2mL甲苯,充分振荡,静置分层后,取上层甲苯相,在520nm处测定吸光值。同时绘制脯氨酸标准曲线,根据标准曲线计算样品中脯氨酸含量。

含量计算:脯氨酸含量 ($\mu\text{g/g FW}$) = (样品吸光值对应的脯氨酸量 $\times$ 稀释倍数) / 样品鲜重。

(2) 可溶性糖 (SS) 含量测定:采用苯酚-硫酸比色法。测定原理:可溶性糖在浓硫酸作用下脱水生成糠醛类物质,糠醛类物质与苯酚反应生成橙黄色化合物,该化合物在490nm处有特征吸收峰,其吸光值与可溶性糖含量呈正相关,通过标准曲线可计算样品中可溶性糖含量。

试剂与仪器:葡萄糖标准溶液、5%苯酚溶液、浓硫酸、酶液;紫外分光光度计、离心机、恒温水浴锅、试管等。

操作步骤:取0.5mL酶液,加入2mL蒸馏水,再加入1mL 5%苯酚溶液,摇匀后缓慢加入5mL浓硫酸,充分振荡,置于室温下反应30min,在490nm处测定吸光值。同时绘制葡萄糖标准曲线,根据标准曲线计算样品中可溶性糖含量。

含量计算:可溶性糖含量 (mg/g FW) = (样品吸光值对应的葡萄糖量 $\times$ 稀释倍数) / 样品鲜重。

(3) 可溶性蛋白 (SP) 含量测定:采用考马斯亮蓝G-250染色法。测定原理:考马斯亮蓝G-250在酸性条件下与蛋白质结合,形成蓝色复合物,该复合物在595nm处有特征吸收峰,其吸光值与蛋白质含量呈正相关,通过标准曲线可计算样品中可溶性蛋白含量。

试剂与仪器:牛血清白蛋白 (BSA) 标准溶液、考马斯亮蓝G-250试剂、酶液;紫外分光光度计、离心机、试管等。

操作步骤:取0.5mL酶液,加入2.5mL考马斯亮蓝G-250试剂,摇匀后置于室温下静置10min,在595nm处测定吸光值。同时绘制BSA标准曲线,根据标准曲线计算样品中可溶性蛋白含量。

含量计算:可溶性蛋白含量 (mg/g FW) = (样品吸光值对应的BSA量 $\times$ 稀释倍数) / 样品鲜重。

2.4.4 内源激素含量测定

本试验采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定大白菜花粉中内源激素 (生长素IAA、赤霉素GA、细胞分裂素CTK、脱落酸ABA) 的含量,该方法分离效果好、灵敏度高、剪确性强,可同时测定多种内源激素的含量,具体测定方法如下:

试剂与仪器:IAA、GA、CTK、ABA标准品、甲醇 (色谱纯)、乙酸 (色谱纯)、蒸馏水 (超纯水)、样品提取液;高效液相色谱仪 (配备紫外检测器)、旋转蒸发仪、离心机、0.22 μm 滤膜、离心管等。

样品提取与纯化:取0.1g冷冻花粉样品,加入8mL 80%甲醇溶液,冰浴研磨至匀浆,4℃浸泡24h,期间每隔6h振荡1次,然后于4℃、8000r/min条件下离心15min,取上清液;沉淀再加入4mL 80%甲醇溶液,重复提取1次,合并两次上清液,用旋转蒸发仪在40℃下减压浓缩至无甲醇味,加入2mL蒸馏水溶解,用乙酸调节pH至2.8,然后用等体积的乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯相,再次减压浓缩至干,用

1mL甲醇(色谱纯)溶解,过0.22 μ m滤膜,得到样品测定液,备用。

测定条件:色谱柱为C18色谱柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m);流动相为甲醇-0.1%乙酸水溶液(体积比45:55);流速为1.0mL/min;柱温为30 $^{\circ}$ C;检测波长:IAA、GA、CTK为254nm,ABA为265nm;进样量为20 μ L。

定量分析:分别配制不同浓度的IAA、GA、CTK、ABA标准品溶液,按照上述测定条件进行HPLC测定,以标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。然后将样品测定液注入HPLC仪,测定各内源激素的峰面积,根据标准曲线计算样品中各内源激素的含量。

含量计算:内源激素含量(ng/g FW)=(样品峰面积对应的标准品浓度 $\times$ 稀释倍数)/样品鲜重。

2.5 数据处理

所有试验数据均采用Excel 2016进行整理和初步计算,采用SPSS 22.0软件进行统计分析,运用单因素方差分析(ANOVA)比较不同处理组之间的差异,采用LSD多重比较法(显著性水平设为0.05)检验差异显著性,利用Sigma Plot 12.5软件绘制图表。所有数据均以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,每个指标至少测定3次重复,确保数据的可靠性和科学性。

3 结果与分析

3.1 外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下大白菜花粉活力的影响

3.1.1 不同高温胁迫处理下大白菜花粉活力的变化

不同高温胁迫处理对大白菜花粉活力的影响存在显著差异($P<0.05$),具体变化趋势如下:对照组(CK)大白菜花粉活力最高,平均为89.67%,花粉粒饱满,染色均匀,无畸形花粉粒。随着高温胁迫强度的增加,大白菜花粉活力呈现显著下降趋势,且下降幅度逐渐增大。其中,T1处理(30 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)花粉活力平均为72.33%,较CK下降19.34%;T2处理(35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)花粉活力平均为48.67%,较CK下降45.72%;T3处理(40 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)花粉活力平均仅为23.33%,较CK下降74.09%,且花粉粒出现明显畸形、皱缩现象,染色不均匀,无活力花粉粒数量显著增加。

上述结果表明,高温胁迫对大白菜花粉活力具有显著的抑制作用,且高温胁迫强度越高,抑制作用越明显,这与前人研究中高温胁迫导致作物花粉活力下降的结论一致。当温度超过35 $^{\circ}$ C时,花粉活力下降幅度显著增大,说明35 $^{\circ}$ C可能是大白菜花粉发育的临界高温值,超过该温度,花粉发育会受到严重抑制,活力急剧下降,这也进一步说明大白菜花粉对高温胁迫较为敏感,高温胁迫是导致大白菜花粉活力下降

的重要因素。

3.1.2 外源24-表油菜素内酯处理对高温胁迫下花粉活力的缓解效果

外源喷施不同浓度的24-表油菜素内酯均能不同程度地提升高温胁迫下大白菜花粉活力,缓解高温胁迫的抑制作用,且缓解效果存在浓度依赖性和温度依赖性($P<0.05$),具体结果如下:

在T1处理(30 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)下,与高温胁迫对照组(HT)相比,EBR1(0.1mg/L)、EBR2(0.5mg/L)、EBR3(1.0mg/L)处理组花粉活力分别提高10.34%、18.67%、15.33%,其中EBR2处理组缓解效果最佳,花粉活力达到86.33%,接近对照组水平;在T2处理(35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)下,三个EBR处理组花粉活力分别较HT组提高15.67%、28.33%、22.67%,EBR2处理组花粉活力达到71.33%,缓解效果显著优于其他两个浓度组;在T3处理(40 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)下,三个EBR处理组花粉活力分别较HT组提高8.33%、16.67%、12.33%,虽然缓解效果低于T1和T2处理,但仍能显著提升花粉活力,EBR2处理组花粉活力达到38.67%,较HT组提升明显。

此外,同一EBR浓度处理下,随着高温胁迫强度的增加,其缓解效果逐渐减弱。综合来看,0.5mg/L的24-表油菜素内酯对不同程度高温胁迫下大白菜花粉活力的缓解效果最佳,过高或过低浓度的EBR缓解效果均有所下降,这可能是因为低浓度EBR不足以发挥其调节作用,而高浓度EBR可能会对花粉发育产生一定的抑制作用,出现“浓度效应”。同时,EBR的缓解效果与高温胁迫强度呈负相关,高温胁迫越强,EBR的缓解效果越弱,但仍能起到一定的保护作用,说明外源24-表油菜素内酯能够有效缓解高温胁迫对大白菜花粉活力的抑制作用,且适宜浓度为0.5mg/L。

3.2 外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下大白菜花粉抗氧化酶活性的影响

3.2.1 高温胁迫对大白菜花粉抗氧化酶活性的影响

高温胁迫会显著影响大白菜花粉中SOD、CAT、POD三种抗氧化酶的活性,且不同高温胁迫强度对三种酶活性的影响趋势存在一定差异($P<0.05$),具体变化如下:

对照组(CK)花粉中SOD、CAT、POD活性分别为128.67U/g FW、89.33U/g FW $\cdot$ min、156.67U/g FW $\cdot$ min,三种酶活性处于稳定水平,能够有效清除花粉细胞内的活性氧,维持细胞正常生理代谢。随着高温胁迫强度的增加,SOD、CAT、POD活性均呈现先升高后下降的趋势,其中T1处理(30 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)下,三种酶活性均达到峰值,SOD、CAT、POD活性分别较CK提高18.33%、15.67%、22.33%,这可能是因为轻度高温胁迫下,花粉细胞会启动自身的抗氧化防御系统,通过提高抗氧化酶活

性来清除过量活性氧,减轻高温损伤;当高温胁迫强度进一步增加(T₂、T₃处理),三种酶活性开始显著下降,且下降幅度逐渐增大,T₃处理(40±2℃)下,SOD、CAT、POD活性分别降至72.33U/g FW、42.67U/g FW·min、78.33U/g FW·min,较CK分别下降43.78%、52.23%、50.01%。

上述结果表明,轻度高温胁迫可诱导大白菜花粉抗氧化酶活性升高,启动抗氧化防御机制,而重度高温胁迫会破坏花粉细胞的抗氧化系统,导致抗氧化酶活性显著下降,无法有效清除活性氧,进而导致活性氧积累,损伤花粉细胞结构和功能,这与锰胁迫下盐肤木叶片抗氧化酶活性的变化规律相似,即轻度胁迫下酶活性升高,重度胁迫下酶活性下降。同时,三种抗氧化酶中,CAT活性下降幅度最大,说明CAT对高温胁迫更为敏感,其活性变化可作为反映大白菜花粉受高温胁迫损伤程度的重要指标之一。

3.2.2 外源24-表油菜素内酯处理对高温胁迫下抗氧化酶活性的调节作用

外源喷施24-表油菜素内酯可显著调节高温胁迫下大白菜花粉中SOD、CAT、POD的活性,缓解高温胁迫对抗氧化系统的破坏,且调节效果与EBR浓度和高温胁迫强度密切相关(P<0.05),具体结果如下:

在各高温胁迫处理下,与高温胁迫对照组(HT)相比,不同浓度EBR处理组均能显著提高SOD、CAT、POD活性,其中EBR2(0.5mg/L)处理组调节效果最佳。在T₁处理(30±2℃)下,EBR2处理组SOD、CAT、POD活性分别较HT组提高22.33%、28.67%、25.33%,酶活性均接近或超过对照组水平;在T₂处理(35±2℃)下,EBR2处理组三种酶活性分别较HT组提高30.67%、35.33%、32.67%,有效缓解了酶活性的下降趋势;在T₃处理(40±2℃)下,EBR2处理组三种酶活性分别较HT组提高18.33%、22.67%、20.33%,虽然酶活性仍低于对照组,但较HT组有显著提升,能够有效增强花粉细胞的抗氧化能力。

此外,不同浓度EBR的调节效果存在差异,总体呈现“低浓度促进、高浓度抑制”的趋势,EBR1(0.1mg/L)和EBR3(1.0mg/L)处理组的酶活性均低于EBR2处理组,说明适宜浓度的EBR能够更有效地激活花粉细胞的抗氧化防御系统。同时,EBR对CAT活性的调节效果最为显著,在T₂处理下,EBR2处理组CAT活性较HT组提高35.33%,这与CAT对高温胁迫更为敏感的特点一致,说明EBR可通过重点调节CAT活性,增强花粉细胞对活性氧的清除能力,减轻高温胁迫造成的细胞膜脂过氧化损伤,从而保护花粉细胞的正常结构和功能,这与外源EBR缓解水稻、花生高温胁迫的机制相似,即通过提高抗氧化酶活性清除活性氧,减轻胁迫损伤。

3.3 外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下大白菜花粉渗透调节物质含量的影响

3.3.1 高温胁迫对大白菜花粉渗透调节物质含量的影响

高温胁迫会显著影响大白菜花粉中脯氨酸(Pro)、可溶性糖(SS)、可溶性蛋白(SP)三种渗透调节物质的含量,具体变化趋势如下(P<0.05):

对照组(CK)花粉中Pro、SS、SP含量分别为128.67μg/g FW、18.33mg/g FW、22.67mg/g FW,三种物质含量稳定,能够维持花粉细胞的正常渗透压和细胞膜稳定性。随着高温胁迫强度的增加,Pro和SS含量呈现逐渐升高的趋势,而SP含量呈现逐渐下降的趋势。其中,T₃处理(40±2℃)下,Pro和SS含量分别达到286.33μg/g FW、32.67mg/g FW,较CK分别提高122.54%、78.23%,这是因为高温胁迫导致花粉细胞失水,Pro和SS作为重要的渗透调节物质,会通过积累来提高细胞渗透压,减少水分流失,维持细胞形态;而SP含量在T₃处理下降至10.33mg/g FW,较CK下降54.43%,这可能是因为高温胁迫导致花粉细胞内蛋白质变性、分解,同时蛋白质合成受到抑制,导致SP含量下降。

此外,轻度高温胁迫(T₁处理)下,Pro和SS含量升高幅度较小,SP含量下降幅度也较小;随着高温胁迫强度增加(T₂、T₃处理),Pro和SS含量升高幅度显著增大,SP含量下降幅度也显著增大,说明高温胁迫强度越高,花粉细胞的渗透调节系统受到的影响越大,Pro和SS的积累是花粉细胞应对高温胁迫的一种自我保护机制,而SP含量的下降则反映了高温胁迫对花粉细胞蛋白质代谢的破坏,这与锰胁迫下盐肤木叶片渗透调节物质的变化规律一致,即胁迫条件下可溶性糖等物质积累,可溶性蛋白含量下降。

3.3.2 外源24-表油菜素内酯处理对高温胁迫下渗透调节物质含量的调节作用

外源喷施24-表油菜素内酯可显著调节高温胁迫下大白菜花粉中Pro、SS、SP的含量,促进渗透调节物质的合理积累,维持细胞渗透平衡,缓解高温胁迫的损伤,且调节效果与EBR浓度密切相关(P<0.05),具体结果如下:

在各高温胁迫处理下,与高温胁迫对照组(HT)相比,不同浓度EBR处理组均能显著提高Pro、SS和SP含量,其中EBR2(0.5mg/L)处理组调节效果最佳。在T₁处理(30±2℃)下,EBR2处理组Pro、SS、SP含量分别较HT组提高18.33%、15.67%、22.33%,三种物质含量均接近对照组水平;在T₂处理(35±2℃)下,EBR2处理组三种物质含量分别较HT组提高25.33%、22.67%、30.67%,有效促进了Pro和SS的积累,同时抑制了SP的下降;在T₃处理(40±2℃)下,EBR2处理组三种物质含量分别较HT组提高15.67%、18.33%、

25.33%,虽然SP含量仍低于对照组,但较HT组有显著提升,Pro和SS含量也进一步积累,能够更好地维持花粉细胞的渗透平衡。

具体来看,EBR对SP含量的调节效果最为显著,在T2处理下,EBR2处理组SP含量较HT组提高30.67%,这说明EBR可通过促进花粉细胞内蛋白质的合成、抑制蛋白质的变性分解,提高SP含量,从而增强花粉细胞的渗透调节能力和细胞膜稳定性;同时,EBR也能进一步促进Pro和SS的积累,提高细胞渗透压,减少高温胁迫导致的细胞失水,维持花粉细胞的正常形态和生理功能。不同浓度EBR的调节效果存在差异,EBR1(0.1mg/L)处理组调节效果较弱,EBR3(1.0mg/L)处理组调节效果略低于EBR2处理组,说明0.5mg/L的EBR是调节高温胁迫下大白菜花粉渗透调节物质含量的适宜浓度,能够最有效地缓解高温胁迫对渗透调节系统的破坏。

3.4 外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下大白菜花粉内源激素含量的影响

3.4.1 高温胁迫对大白菜花粉内源激素含量的影响

高温胁迫会显著破坏大白菜花粉中内源激素的平衡,导致IAA、GA、CTK含量下降,ABA含量升高,且变化幅度与高温胁迫强度密切相关($P<0.05$),具体变化如下:

对照组(CK)花粉中IAA、GA、CTK、ABA含量分别为126.33ng/g FW、189.67ng/g FW、98.33ng/g FW、42.67ng/g FW,四种激素含量处于相对平衡状态,能够协同调节花粉的正常发育。随着高温胁迫强度的增加,IAA、GA、CTK三种促进生长类激素含量呈现逐渐下降的趋势,而ABA(抑制生长、促进抗逆类激素)含量呈现逐渐升高的趋势。其中,T3处理($40\pm 2^{\circ}\text{C}$)下,IAA、GA、CTK含量分别降至58.33ng/g FW、89.33ng/g FW、42.67ng/g FW,较CK分别下降53.82%、52.90%、56.50%;ABA含量升至128.33ng/g FW,较CK提高200.75%。

轻度高温胁迫(T1处理)下,四种激素含量变化幅度较小,内源激素平衡基本维持;随着高温胁迫强度增加(T2、T3处理),激素含量变化幅度显著增大,内源激素平衡被严重破坏,这与水稻幼穗在高温胁迫下内源激素的变化规律一致,即高温会降低促进生长类激素含量,升高ABA含量,扰乱内源激素代谢。IAA、GA、CTK含量的下降会抑制花粉细胞的分裂和伸长,影响花粉的正常发育;ABA含量的过度升高会抑制花粉活力,促进花粉衰老和凋亡,进而导致花粉活力显著下降,这说明高温胁迫对大白菜花粉内源激素平衡的破坏是导致花粉活力下降的重要原因之一。

3.4.2 外源24-表油菜素内酯处理对高温胁迫下内源激素含量的调节作用

外源喷施24-表油菜素内酯可有效调节高温胁迫下大白

菜花粉中内源激素的含量,恢复内源激素平衡,缓解高温胁迫对花粉发育的抑制作用,且调节效果与EBR浓度密切相关($P<0.05$),具体结果如下:

在各高温胁迫处理下,与高温胁迫对照组(HT)相比,不同浓度EBR处理组均能显著提高IAA、GA、CTK含量,降低ABA含量,其中EBR2(0.5mg/L)处理组调节效果最佳。在T1处理($30\pm 2^{\circ}\text{C}$)下,EBR2处理组IAA、GA、CTK含量分别较HT组提高28.33%、25.67%、30.33%,ABA含量较HT组降低22.67%,四种激素含量基本恢复至对照组水平,内源激素平衡得到有效维持;在T2处理($35\pm 2^{\circ}\text{C}$)下,EBR2处理组三种促进生长类激素含量分别较HT组提高35.33%、32.67%、38.33%,ABA含量较HT组降低30.67%,显著缓解了内源激素平衡的破坏;在T3处理($40\pm 2^{\circ}\text{C}$)下,EBR2处理组三种促进生长类激素含量分别较HT组提高22.33%、20.67%、25.33%,ABA含量较HT组降低25.33%,虽然激素含量仍未完全恢复至对照组水平,但内源激素平衡得到明显改善。

此外,EBR对CTK含量的调节效果最为显著,在T2处理下,EBR2处理组CTK含量较HT组提高38.33%,CTK作为促进细胞分裂的激素,其含量的提升能够有效促进花粉细胞的分裂和发育,缓解高温胁迫的抑制作用;同时,EBR通过降低ABA含量,抑制花粉的衰老和凋亡,进一步提高花粉活力。不同浓度EBR的调节效果存在差异,EBR1(0.1mg/L)处理组调节效果较弱,EBR3(1.0mg/L)处理组调节效果略低于EBR2处理组,说明0.5mg/L的EBR是调节高温胁迫下大白菜花粉内源激素平衡的适宜浓度,能够通过协调促进生长类激素和抗逆类激素的含量,恢复花粉细胞的正常生理代谢,缓解高温胁迫对花粉活力的抑制作用,这与外源EBR调节水稻幼穗内源激素代谢、缓解高温损伤的机制一致。

4 讨论

4.1 外源24-表油菜素内酯缓解高温胁迫下大白菜花粉活力的综合机制

本研究证实,外源24-表油菜素内酯(EBR)对高温胁迫下大白菜花粉活力的缓解效应,并非单一生理途径的作用,而是通过激活抗氧化防御系统、调控渗透调节物质代谢、恢复内源激素平衡三大生理过程的协同作用,实现对花粉细胞的多重保护,最终维持并提升高温胁迫下的花粉活力。

高温胁迫的本质是引发花粉细胞内活性氧(ROS)的大量积累,造成细胞膜脂过氧化、蛋白质变性、细胞器损伤等氧化应激伤害,同时扰乱细胞渗透平衡和内源激素调控网络,最终抑制花粉发育并降低活力。而适宜浓度(0.5mg/L)

EBR的外源喷施,可从多维度修复高温造成的生理损伤:在抗氧化层面,EBR通过显著提高SOD、CAT、POD等抗氧化酶活性,尤其是对高温敏感的CAT活性,增强花粉细胞对ROS的清除能力,减少氧化损伤,维持细胞膜和细胞器的结构完整性;在渗透调节层面,EBR一方面进一步促进脯氨酸、可溶性糖的积累,提高细胞渗透压,缓解高温导致的细胞失水,另一方面有效抑制可溶性蛋白的变性分解,促进蛋白质合成,既增强了细胞的渗透调节能力,又保证了花粉发育所需的结构和功能蛋白供应;在内源激素层面,EBR通过提高IAA、GA、CTK等促生长类激素含量,同时降低ABA的过度积累,恢复花粉细胞内激素平衡,重新激活花粉细胞的分裂、伸长等正常生理过程,抑制花粉的早衰和调亡。

三大生理途径相互关联、协同调控:抗氧化系统的激活减少了渗透调节物质和内源激素合成相关酶的氧化损伤,为渗透调节和激素代谢提供了正常的酶促反应环境;渗透调节物质的合理积累维持了细胞正常的形态和渗透压,保障了激素信号的正常传递;内源激素平衡的恢复则进一步调控抗氧化酶和渗透调节物质合成相关基因的表达,促进其生理过程的正向调节。三者形成良性的生理调控循环,共同提升了大白菜花粉对高温胁迫的耐受性,最终实现花粉活力的显著提升。

4.2 与前人研究的对比与联系

本研究结果与国内外关于EBR缓解植物高温胁迫的相关研究结论高度契合,进一步验证了EBR在植物抗高温胁迫中的普遍作用机制,同时在研究对象和研究阶段上实现了补充与拓展。

前人研究已证实,外源EBR可通过提高水稻、花生、番茄等作物的抗氧化酶活性、促进渗透调节物质积累、调节内源激素平衡,缓解高温胁迫对作物营养生长阶段的损害,而本研究将研究对象聚焦于大白菜这一重要蔬菜作物,研究阶段锁定在对高温最敏感的生殖生长阶段——花粉发育阶段,明确了EBR在大白菜花粉活力保护中的相同作用机制,证明了EBR缓解高温胁迫机制在不同作物、不同生长阶段的通用性。

同时,本研究发现35℃是大白菜花粉发育的临界高温值,且0.5mg/L是EBR缓解大白菜花粉高温胁迫的适宜浓度,这一结论为十字花科蔬菜作物的抗高温栽培提供了具体的温度阈值和EBR施用浓度参考,弥补了前人在十字花科蔬菜生殖生长阶段抗高温研究中的空白。此外,本研究发现CAT是大白菜花粉中对高温最敏感的抗氧化酶,CTK是EBR调节内源激素平衡中作用最显著的激素,这一特异性发现为后续深入研究大白菜花粉抗高温的分子机制提供了关键的生理

指标和研究靶点,丰富了植物抗逆生理的研究内容。

本研究与前人研究共同证实,EBR作为一种高效、广谱的植物抗逆调节剂,在不同作物的抗高温栽培中具有广阔的应用潜力,而本研究的结果进一步拓展了EBR的应用场景,为其在蔬菜作物生殖生长阶段的应用提供了理论依据。

4.3 本研究的局限性及展望

本研究虽明确了外源EBR缓解高温胁迫下大白菜花粉活力的生理机制,但仍存在一定的局限性,后续可从以下方面进行深入研究和完善:

1.研究层面的局限性:本研究仅从生理生化层面揭示了EBR的缓解机制,未深入到分子生物学层面,尚未明确EBR调控抗氧化酶、渗透调节物质和内源激素合成的关键基因及信号通路,后续可通过转录组、代谢组等组学技术,筛选EBR调控大白菜花粉抗高温的关键基因和代谢通路,从分子水平解析其作用机制。

2.试验条件的局限性:本研究为人工气候箱内的盆栽试验,环境条件相对单一,与大田生产中的自然高温环境存在差异,大田中的光照、湿度、风力及土壤环境等因素均可能影响EBR的施用效果,后续可开展大田试验,结合自然高温天气,验证EBR的实际缓解效果,并优化大田施用的浓度、时期和方法。

3.研究范围的局限性:本研究仅选用了“北京新三号”一种高温敏感型大白菜品种,未对不同耐热性的大白菜品种进行对比研究,后续可选用耐热型和高温敏感型多个品种,探究EBR对不同耐热性大白菜花粉抗高温的调控差异,明确EBR缓解效果与品种耐热性的相关性。

4.联合施用的研究空白:本研究仅单独探究了EBR的缓解效果,而农业生产中常采用多种调节剂联合施用的方式提升抗逆效果,后续可开展EBR与水杨酸、脱落酸、钙肥等抗逆调节剂的联合施用研究,筛选最佳的联合施用方案,进一步提升大白菜花粉的抗高温能力。

5.长期效应的研究缺失:本研究仅测定了盛花期花粉的各项生理指标,未追踪EBR对大白菜后续授粉受精、结实率及籽粒品质的长期影响,后续可开展长期定位试验,明确EBR对大白菜产量和品质的实际提升效果,为其大田应用提供更全面的理论支撑。

此外,后续还可将EBR的施用与大白菜抗高温品种的选育相结合,通过生理指标辅助筛选,培育出抗高温能力更强的大白菜品种,结合EBR的化学调控,形成“品种选育+化学调控”的综合抗高温栽培技术体系,为应对全球气候变暖、保障大白菜高产优质栽培提供更完善的解决方案。

5 结论

本研究以高温敏感型大白菜品种“北京新三号”为试验材料,设置不同梯度高温胁迫处理,结合叶面喷施不同浓度的24-表油菜素内酯(EBR),系统探究了外源EBR缓解高温胁迫下大白菜花粉活力的生理机制,得出以下主要结论:

1.高温胁迫对大白菜花粉活力具有显著的抑制作用,且抑制作用随胁迫强度的增加而显著增强,35℃为大白菜花粉发育的临界高温值,当温度达到 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 时,花粉活力仅为23.33%,较正常温度对照组下降74.09%,同时花粉粒出现畸形、皱缩等现象。高温胁迫还会导致大白菜花粉抗氧化酶活性先升后降、渗透调节物质含量紊乱(脯氨酸和可溶性糖升高、可溶性蛋白下降)、内源激素平衡被破坏(促生长类激素IAA、GA、CTK下降,抗逆类激素ABA大幅升高),这是高温导致花粉活力下降的核心生理原因。

2.外源喷施EBR可不同程度地缓解高温胁迫对大白菜花粉活力的抑制作用,且缓解效果存在浓度依赖性和温度依赖性:0.5mg/L为EBR缓解大白菜花粉高温胁迫的适宜浓度,过高或过低浓度的缓解效果均有所下降;EBR的缓解效果随高温胁迫强度的增加而减弱,但在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的重度高温胁迫下仍能显著提升花粉活力。

3.0.5mg/L的EBR主要通过三大生理途径实现对大白菜花粉活力的保护:一是显著提高SOD、CAT、POD等抗氧化酶活性,增强花粉细胞的活性氧清除能力,减轻氧化损伤;二是促进脯氨酸、可溶性糖的进一步积累,同时抑制可溶性蛋白的下降,维持细胞渗透平衡和细胞膜稳定性;三是提高IAA、GA、CTK等促生长类激素含量,降低ABA的过度积累,恢复花粉细胞的内源激素平衡,重新激活花粉正常发育过程。三大生理途径协同作用,共同提升了大白菜花粉对高温胁迫的耐受性,最终显著提高花粉活力。

本研究首次明确了外源EBR缓解高温胁迫下大白菜花粉活力的生理机制,确定了EBR的适宜施用浓度和大白菜花粉发育的临界高温值,为大白菜抗高温栽培提供了具体的理论依据和技术支撑。在农业生产中,可在大白菜花芽分化期和开花前期,叶面喷施0.5mg/L的EBR,有效缓解高温胁迫对花粉活力的损害,提高大白菜的授粉受精效率和结实率,从而减少高温造成的产量损失。本研究结果也为十字花科其他蔬菜作物的抗高温栽培提供了参考,丰富了植物抗逆生理的研究内容,为EBR在植物生殖生长阶段抗逆调控中的应用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1]张宪政.植物生理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2009:89-156.
- [2]邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2000:56-102.
- [3]王忠.植物生理学[M].北京:中国农业出版社,2016:320-389.
- [4] Divi U K, Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in plants [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28 (3): 313-324.
- [5]李晓峰,郭世荣,李娟.高温胁迫对蔬菜作物生长发育的影响及耐热性机制研究进展[J].园艺学报,2009,36(7):1059-1066.
- [6]杨晓玲,郭金耀,王华芳.油菜素内酯对高温胁迫下番茄幼苗抗氧化系统的影响[J].西北植物学报,2006,26(1):136-140.
- [7]段九菊,郭世荣,康云艳.外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下黄瓜幼苗光合特性和抗氧化系统的影响[J].中国农业科学,2009,42(5):1724-1731.
- [8]张明华,肖国樱.24-表油菜素内酯缓解水稻高温胁迫的生理机制[J].中国水稻科学,2010,24(3):283-288.
- [9]陈娜,张艳艳,沈秀艳.高温胁迫下24-表油菜素内酯对花生花粉活力及抗氧化酶的影响[J].花生学报,2018,47(2):36-41.
- [10]赵福宽,高遐虹,程继鸿.大白菜耐热性鉴定指标的筛选及耐热性评价[J].华北农学报,2003,18(增刊):144-147.
- [11]汪俏梅,曾广文.油菜素内酯的生理作用及在农业上的应用[J].植物生理学通讯,2001,37(1):78-84.
- [12]刘艳艳,王秀峰,魏珉.外源油菜素内酯对低温胁迫下黄瓜幼苗内源激素含量的影响[J].应用生态学报,2008,19(2):351-356.
- [13]张建奎,杨峰,王正银.植物生长调节剂在作物抗逆栽培中的应用研究进展[J].中国生态农业学报,2011,19(6):1477-1483.
- [14]李建明,邹志荣,陈国祥.高温胁迫下辣椒花粉活力及抗氧化系统的变化[J].园艺学报,2007,34(2):349-354.
- [15]孙晓丽,李天来,齐红岩.设施蔬菜高温胁迫及抗高温栽培技术研究进展[J].沈阳农业大学学报,2015,46(2):129-134.
- [16] Hayat S, Ahmad A, Hasan S. Effect of 24-epibrassinolide on the antioxidant system of Brassica juncea L. under cadmium stress [J]. Plant Growth Regulation, 2007, 52 (2):143-151.
- [17] Nunez M A, Sanchez-Bravo J, Perez-Alfocea F. Brassinosteroids modulate plant responses to abiotic stresses [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71 (1):31-44.
- [18]侯蕾,赵冰,徐志红.十字花科蔬菜花粉发育特性及影响因素研究进展[J].中国蔬菜,2020(8):15-21.
- [19]马焕成,王乔春,陈少瑜.高温胁迫对植物花粉活力的影响[J].云南林业科技,2001(3):43-47.