

外源 24-表油菜素内酯通过促进 AsA-GSH 循环增强猕猴桃耐涝性

杨雅慧

(湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128)

摘要：猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 是我国特色果树，肉质根系特性使其对涝害胁迫极为敏感，涝害已成为制约猕猴桃产业高质量发展的主要非生物逆境因素之一。24-表油菜素内酯 (24-epibrassinolide, 24-epiBL) 作为一种活性较高的油菜素内酯 (Brassinosteroids, BRs) 类似物，在调控植物抗逆性方面发挥着重要作用，而抗坏血酸-谷胱甘肽 (Ascorbate-Glutathione, AsA-GSH) 循环是植物体内清除活性氧、维持氧化还原平衡的核心抗氧化系统，其运转效率直接决定植物对逆境胁迫的耐受能力。本研究以‘红阳’猕猴桃幼苗为试材，通过人工模拟涝害胁迫，设置不同浓度24-epiBL预处理，系统探究外源24-epiBL对涝害胁迫下猕猴桃生长状况、氧化损伤及AsA-GSH循环系统的影响，同时分析抗氧化相关基因的表达模式，明确24-epiBL通过调控AsA-GSH循环增强猕猴桃耐涝性的生理及分子机制。结果表明：涝害胁迫显著抑制猕猴桃幼苗生长，导致植株形态异常、生物量积累减少、根系活力下降，同时引发活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 大量积累，加剧膜脂过氧化损伤，降低AsA-GSH循环关键酶 (抗坏血酸过氧化物酶APX、谷胱甘肽还原酶GR、脱氢抗坏血酸还原酶DHAR、单脱氢抗坏血酸还原酶MDHAR) 活性，破坏AsA和GSH的氧化还原平衡，下调抗氧化相关基因表达。外源24-epiBL预处理可有效缓解上述涝害损伤，其中以 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理效果最佳，能显著改善涝害下猕猴桃植株形态，提高生物量积累和根系活力；降低叶片相对电导率、丙二醛 (MDA) 含量及 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 积累水平；显著提高APX、GR、DHAR、MDHAR活性，增加还原型AsA (AsA)、还原型GSH (GSH) 含量，维持较高的AsA/DHA (脱氢抗坏血酸) 和GSH/GSSG (氧化型谷胱甘肽) 比值；显著上调APX基因家族、GR基因及GSH合成关键基因 (γ -ECS、GS) 的表达水平。综上，外源24-epiBL可通过促进AsA-GSH循环的高效运转，增强猕猴桃体内ROS清除能力，维持细胞氧化还原平衡，减轻膜脂过氧化损伤，从而增强猕猴桃对涝害胁迫的耐受性。本研究为猕猴桃抗涝栽培提供了新的技术途径和理论依据，也为深入解析BRs调控果树抗逆性的分子机制奠定基础。

关键词：猕猴桃；24-表油菜素内酯；涝害胁迫；AsA-GSH循环；抗氧化酶；氧化还原平衡；耐涝性

中图分类号：S663.4

文献标识码：A

文章编号：3106-2547 (2025) 05-0001-11

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.05.001

Exogenous 24-epibrassinolide Enhances Waterlogging Tolerance of Kiwifruit by Promoting AsA-GSH Cycle

Yang Yahui

(College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract: Kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) is a characteristic fruit tree in China. Its fleshy root system makes it extremely sensitive to waterlogging stress, which has become one of the main abiotic stress factors restricting the high-quality development of the kiwifruit industry. 24-epibrassinolide (24-epiBL), a brassinosteroid (BRs) analog with high activity, plays an important role in regulating plant stress resistance. The ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle is the core antioxidant system in plants that scavenges reactive oxygen species (ROS) and maintains redox balance, and its operation efficiency directly determines the plant's tolerance to adverse stresses. In this study, 'Hongyang' kiwifruit seedlings were used as test materials, and artificial waterlogging stress was simulated. Different concentrations of 24-epiBL pretreatment were set to systematically explore the effects of exogenous 24-epiBL on the growth status, oxidative damage and AsA-GSH cycle system of kiwifruit under waterlogging stress. At the same time, the expression patterns of antioxidant-related genes were analyzed to clarify the physiological and molecular mechanisms by which 24-epiBL enhances kiwifruit waterlogging tolerance by regulating the AsA-GSH cycle. The results showed that waterlogging stress significantly inhibited the growth of kiwifruit seedlings, leading to abnormal plant morphology, reduced biomass accumulation, decreased root activity, and massive accumulation of reactive oxygen species (ROS), which aggravated membrane lipid peroxidation damage, reduced the activities of key enzymes in the AsA-GSH cycle (ascorbate peroxidase APX,

作者简介：杨雅慧，博士，副教授，研究方向为果树逆境生理与栽培调控。

glutathione reductase GR, dehydroascorbate reductase DHAR, monodehydroascorbate reductase MDHAR), destroyed the redox balance of AsA and GSH, and down-regulated the expression of antioxidant-related genes. Exogenous 24-epiBL pretreatment could effectively alleviate the above waterlogging damage, among which $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 24-epiBL pretreatment had the best effect. It could significantly improve the plant morphology of kiwifruit under waterlogging, increase biomass accumulation and root activity; reduce leaf relative conductivity, malondialdehyde (MDA) content and H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ accumulation levels; significantly increase the activities of APX, GR, DHAR and MDHAR, increase the contents of reduced AsA (AsA) and reduced GSH (GSH), and maintain high AsA/DHA (dehydroascorbate) and GSH/GSSG (oxidized glutathione) ratios; significantly up-regulate the expression levels of APX gene family, GR gene and GSH synthesis key genes (γ -ECS, GS). In conclusion, exogenous 24-epiBL can enhance the ROS scavenging capacity in kiwifruit, maintain cellular redox balance, and reduce membrane lipid peroxidation damage by promoting the efficient operation of the AsA-GSH cycle, thereby enhancing the tolerance of kiwifruit to waterlogging stress. This study provides a new technical approach and theoretical basis for kiwifruit waterlogging-resistant cultivation, and also lays a foundation for in-depth analysis of the molecular mechanism of BRs regulating fruit tree stress resistance.

Keywords: Kiwifruit; 24-epibrassinolide; waterlogging stress; AsA-GSH cycle; antioxidant enzymes; redox balance; waterlogging tolerance

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 猕猴桃产业现状及涝害胁迫的危害性

猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 隶属于猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属 (*Actinidia*), 是一种起源于中国、营养价值极高的落叶藤本果树, 因其果实富含维生素C、膳食纤维、氨基酸及多种矿物质, 被誉为“水果之王”, 在国内外市场上具有极高的经济价值和市场竞争力^[1]。近年来, 随着人们生活水平的提高和健康意识的增强, 猕猴桃的市场需求持续扩大, 推动了全球猕猴桃产业的快速发展。我国作为猕猴桃的原产国和主要生产国, 栽培面积和产量均居世界首位, 截至2024年, 全国猕猴桃栽培面积已超过30万公顷, 年产量突破400万吨, 主产区主要分布在陕西、四川、湖北、湖南、贵州等省份, 猕猴桃产业已成为我国南方山区、丘陵地带农民增收致富的支柱产业之一, 在乡村振兴战略实施中发挥着重要作用。

然而, 猕猴桃的生长发育对环境条件要求较为苛刻, 尤其是其根系为肉质须根, 通气性差、忌积水, 对土壤水分含量极为敏感, 涝害胁迫已成为制约猕猴桃产业高质量发展的主要非生物逆境因素之一^[2]。在我国猕猴桃主产区, 夏季多暴雨、梅雨季节降水集中, 加之部分果园地势低洼、排水不畅, 极易导致土壤积水, 引发猕猴桃涝害。据统计, 我国每年因涝害造成的猕猴桃产量损失达15%~30%, 严重年份甚至超过50%, 同时涝害还会导致猕猴桃果实品质下降、树势衰弱, 增加病虫害发生风险, 缩短树体寿命, 给果农带来巨大的经济损失。

涝害胁迫对猕猴桃的危害是多方面、多层次的, 主要体现在以下几个方面: 一是破坏根系呼吸作用, 土壤积水后, 土壤孔隙被水分填充, 氧气含量急剧下降, 导致猕猴桃根系缺氧, 有氧呼吸受阻, 被迫转向无氧呼吸, 产生大量乙醇、乳酸等有毒代谢产物, 抑制根系细胞分裂和伸长, 导致根系

腐烂、活力下降, 进而影响根系对水分和养分的吸收运输, 最终导致植株地上部生长受阻; 二是引发活性氧 (ROS) 大量积累, 涝害胁迫下, 猕猴桃体内氧化与抗氧化系统失衡, ROS (如 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 等) 大量产生, 这些活性氧具有强氧化性, 会攻击细胞内的蛋白质、核酸、脂质等生物大分子, 导致细胞膜脂过氧化, 破坏细胞膜结构和功能, 造成细胞损伤甚至死亡; 三是影响光合作用和物质代谢, 涝害导致猕猴桃叶片发黄、萎蔫, 叶绿素含量下降, 光合速率降低, 同时呼吸作用紊乱, 物质合成小于分解, 导致植株生物量积累减少, 果实发育受阻, 品质降低; 四是破坏体内激素平衡, 涝害胁迫会导致猕猴桃体内脱落酸 (ABA)、乙烯等逆境激素含量升高, 赤霉素 (GA)、生长素 (IAA) 等促进生长的激素含量降低, 进一步抑制植株生长, 加速叶片脱落和果实脱落。

目前, 针对猕猴桃涝害的防控措施主要包括改良果园排水设施、选择耐涝品种、合理修剪、土壤改良等, 但这些措施存在见效慢、成本高、适用范围有限等问题, 难以满足猕猴桃产业规模化、集约化发展的需求。因此, 寻找一种高效、便捷、低成本的调控技术, 提高猕猴桃的耐涝性, 减轻涝害损失, 已成为当前猕猴桃栽培研究中的迫切需求, 对推动猕猴桃产业高质量发展具有重要的理论意义和实践价值^[3]。

猕猴桃不同品种间的耐涝性存在显著差异, 已有研究表明, 大籽猕猴桃‘KR2’、对萼猕猴桃‘KR5’和‘水秀’品种耐涝性较强, 而美味猕猴桃‘15-13’、软枣猕猴桃‘永丰一号’及中华猕猴桃‘红阳’品种耐涝性较弱, 不耐涝品种在涝害胁迫下易出现根系腐烂、叶片萎蔫等症状, 产量和品质受损更为严重。本研究选用不耐涝的‘红阳’猕猴桃作为试材, 探究外源24-epiBL对其耐涝性的调控作用, 更能体现调控措施的实际应用价值, 为不耐涝猕猴桃品种的抗涝栽培提供技术支撑。

1.1.2 植物耐涝机制研究进展

植物耐涝性是指植物在土壤积水或水分过多的环境中,

通过自身的生理、生化及分子水平的调节,抵御或减轻涝害损伤,维持正常生长发育的能力。植物对涝害胁迫的响应是一个复杂的调控过程,涉及多个生理代谢途径和分子机制,近年来,国内外学者对植物耐涝机制进行了大量研究,取得了显著进展,主要集中在以下几个方面。

一是根系形态与结构的适应性调整。根系作为植物吸收水分和养分的主要器官,也是最先受到涝害胁迫影响的器官,耐涝植物往往通过调整根系形态和结构来适应缺氧环境^[4]。例如,耐涝植物会促进不定根和通气组织的形成,不定根可以增加根系的吸收面积,通气组织则可以通过细胞间隙连接,将空气中的氧气输送到根系内部,缓解根系缺氧胁迫。研究发现,水稻、玉米等耐涝作物在涝害胁迫下,根系皮层细胞会发生程序性死亡,形成通气组织,提高根系的通气能力;猕猴桃耐涝品种‘KR2’和‘KR5’在涝害胁迫下,能维持较高的根系活力,减少根系腐烂,从而保证地上部的正常生长。此外,耐涝植物还会通过增加根系的比表面积、提高根系活力等方式,增强根系对水分和养分的吸收能力,缓解涝害损伤。

二是无氧呼吸代谢的调控。涝害胁迫下,土壤缺氧导致植物根系有氧呼吸受阻,无氧呼吸成为主要的能量供应方式。但无氧呼吸产生的ATP量较少,且会积累乙醇、乳酸等有毒代谢产物,对细胞造成损伤^[5]。耐涝植物通过调控无氧呼吸代谢,减少有毒产物积累,维持能量供应,从而适应涝害环境。例如,耐涝植物会提高乙醇脱氢酶(ADH)、乳酸脱氢酶(LDH)等无氧呼吸关键酶的活性,促进有毒代谢产物的分解和转化;同时,部分耐涝植物还会通过调整呼吸途径,如增强丙酮酸-丙氨酸途径,减少乙醇积累,缓解无氧呼吸带来的损伤。对尊猕猴桃‘水秀’在淹水胁迫下,乙醇含量很快下降且保持在较低水平,积累了较高浓度的丙氨酸,以丙酮酸-丙氨酸途径为主,表现出较强的耐涝性,而不耐涝的‘红阳’猕猴桃则以丙酮酸-乙醇途径为主,乙醇大量积累,损伤严重。

三是抗氧化系统的激活。涝害胁迫会导致植物体内ROS大量积累,引发氧化损伤,而抗氧化系统是植物抵御ROS损伤的主要防线。植物的抗氧化系统主要包括酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统,其中酶促抗氧化系统主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等;非酶促抗氧化系统主要包括抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)、类胡萝卜素、黄酮类物质等。耐涝植物在涝害胁迫下,会显著提高抗氧化酶的活性,增加非酶抗氧化物质的含量,增强ROS清除能力,维持体内氧化与抗氧化平衡,减轻膜脂过氧化损伤^[6]。研究表明,淹水胁迫下,耐涝猕猴桃

品种‘水秀’根系的SOD活性始终维持在较高水平,CAT、POD活性通过动态调整清除过量ROS,而不耐涝的‘红阳’猕猴桃抗氧化酶活性提升不足,ROS积累过多,损伤严重。毛竹在高温干旱胁迫下,也能通过调节抗氧化酶系统和AsA-GSH循环协同作用,清除ROS,提高抗逆能力。

四是激素信号的调控。植物激素在调控植物耐涝性方面发挥着重要作用,涝害胁迫下,植物体内多种激素的含量会发生显著变化,通过信号转导途径调控相关基因的表达,进而影响植物的耐涝响应。例如,脱落酸(ABA)作为一种重要的逆境激素,在涝害胁迫下含量会显著升高,通过诱导气孔关闭、促进抗氧化酶活性提高、调控逆境相关基因表达等方式,增强植物的耐涝性;乙烯在涝害胁迫下也会大量积累,促进不定根形成和通气组织发育,缓解涝害损伤;此外,赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTK)、油菜素内酯(BRs)等激素也能通过不同的途径调控植物的耐涝性,其中BRs作为一种新型植物激素,在调控植物抗逆性方面的作用受到越来越多的关注。

五是分子水平的调控。随着分子生物学技术的发展,越来越多的植物耐涝相关基因被克隆和鉴定,这些基因主要涉及抗氧化、无氧呼吸、激素信号转导、根系发育等多个方面。例如,APX、GR、SOD等抗氧化相关基因,在涝害胁迫下会被显著诱导表达,提高植物的ROS清除能力;ADH、LDH等无氧呼吸相关基因,通过调控无氧呼吸代谢,减少有毒产物积累;ERF、WRKY、MYB等转录因子,通过调控下游耐涝相关基因的表达,参与植物耐涝响应的调控。毛花猕猴桃全基因组中鉴定出29个AeAPX基因家族成员,其表达与AsA含量密切相关,在植物抗逆过程中发挥重要作用。这些研究为深入解析植物耐涝的分子机制提供了重要依据,也为通过基因工程手段培育耐涝植物品种奠定了基础。

尽管植物耐涝机制的研究已取得了一定进展,但不同植物的耐涝机制存在显著差异,尤其是果树类植物,其耐涝机制更为复杂,目前关于猕猴桃耐涝机制的研究还相对薄弱,主要集中在生理水平,对分子水平的调控机制研究较少,尤其是外源物质调控猕猴桃耐涝性的分子机制尚未明确,有待进一步深入研究。

1.1.3 24-表油菜素内酯(24-epiBL)的生理功能及应用前景

油菜素内酯(Brassinosteroids, BRs)是一类新型植物激素,于1970年首次从油菜花粉中分离得到,因其具有显著的促进植物生长发育、提高抗逆性等生理功能,被称为“第六大植物激素”。BRs广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实等各个器官中,参与调控植物的生长发育、细胞分裂、分化、衰老、逆境响应等多个生理过程^[7]。24-表油菜素内酯(24-epibrassinolide, 24-epiBL)是BRs家族中活性较高的一

种天然类似物,具有来源广泛、活性稳定、毒性低、环境友好等特点,在农业生产中具有广阔的应用前景。

24-epiBL的生理功能主要体现在以下几个方面:一是促进植物生长发育,24-epiBL能促进植物细胞的分裂和伸长,提高光合作用效率,增加生物量积累,促进果实发育和成熟,改善果实品质。研究表明,外源24-epiBL处理能显著促进番茄、黄瓜、水稻等作物的生长,提高产量和品质;二是调控植物的生殖发育,24-epiBL能促进花芽分化、开花和坐果,减少落花落果,提高结实率。例如,24-epiBL处理能显著提高苹果、梨等果树的坐果率,改善果实外观和内在品质;三是增强植物的抗逆性,这是24-epiBL最受关注的生理功能之一,大量研究表明,外源24-epiBL能显著提高植物对干旱、盐胁迫、低温、高温、涝害、病虫害等多种逆境胁迫的耐受性,其调控机制主要与激活抗氧化系统、调节激素平衡、促进逆境相关基因表达等有关。

在抗逆性调控方面,24-epiBL对植物耐涝性的调控作用已在多种作物中得到证实。例如,外源24-epiBL处理能显著缓解涝害胁迫对水稻、玉米、黄瓜等作物的损伤,提高植株的耐涝性。研究发现,24-epiBL能通过提高涝害胁迫下作物的抗氧化酶活性,减少ROS积累,减轻膜脂过氧化损伤;促进根系通气组织形成和不定根生长,提高根系活力;调控无氧呼吸代谢,减少有毒产物积累;调节激素平衡,促进生长激素的合成,抑制逆境激素的过度积累^[8]。在黄瓜幼苗中,24-epiBL能通过提高APX、GR、DHAR等抗氧化酶活性,增加AsA、GSH含量,促进AsA-GSH循环运转,减轻亚适宜温光盐环境下的氧化损伤,促进根系生长。此外,24-epiBL还能通过调控耐涝相关基因的表达,增强植物的耐涝响应,例如,24-epiBL处理能显著上调水稻中APX、GR、ADH等基因的表达,提高水稻的耐涝性。

24-epiBL作为一种环境友好型植物生长调节剂,在农业生产中具有广泛的应用前景。目前,24-epiBL已被应用于水稻、小麦、玉米、蔬菜、果树等多种作物的栽培中,取得了显著的增产、提质、抗逆效果^[9]。在果树栽培中,24-epiBL已被用于调控苹果、梨、葡萄、柑橘等果树的生长发育和抗逆性,但在猕猴桃栽培中的应用研究还相对较少,尤其是关于24-epiBL调控猕猴桃耐涝性的研究尚未见报道。因此,开展外源24-epiBL对猕猴桃耐涝性的调控研究,明确其调控机制,不仅能丰富BRs调控果树抗逆性的理论体系,还能为猕猴桃抗涝栽培提供一种新的技术手段,具有重要的实践应用价值。

24-epiBL调控植物抗逆性的核心机制之一是激活植物体内的抗氧化系统,直接激活植物受体,启动抗氧化相关基因表达,增强胁迫蛋白表达,清除自由基,维持细胞稳态。

已有研究表明,24-epiBL能显著提高多种植物在逆境胁迫下的抗氧化酶活性,调节非酶抗氧化物质含量,而AsA-GSH循环作为植物体内核心的抗氧化系统,可能是24-epiBL调控植物抗逆性的重要靶点,但目前关于24-epiBL通过调控AsA-GSH循环增强猕猴桃耐涝性的研究尚未开展,这也是本研究的核心切入点之一。

1.1.4 AsA-GSH循环在植物抗逆中的作用机制

抗坏血酸-谷胱甘肽(Ascorbate-Glutathione, AsA-GSH)循环是植物体内普遍存在的一种高效抗氧化系统,由Foyer和Halliwell于1976年首次提出,该循环通过一系列酶促反应,高效清除植物体内的ROS,尤其是 H_2O_2 ,维持细胞内氧化还原平衡,保护细胞免受氧化损伤,在植物抗逆性调控中发挥着核心作用。AsA-GSH循环广泛存在于植物的叶绿体、线粒体、细胞质、peroxisome等细胞器中,其运转效率直接决定植物对逆境胁迫的耐受能力。

AsA-GSH循环的运转过程主要包括以下一系列酶促反应:首先,抗坏血酸过氧化物酶(APX)以还原型抗坏血酸(AsA)为电子供体,将 H_2O_2 还原为水,同时AsA被氧化为单脱氢抗坏血酸(MDHA);MDHA具有不稳定性,可通过非酶促反应自发歧化为脱氢抗坏血酸(DHA)和AsA,也可在单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)的催化下,以NADPH为电子供体,还原为AsA;DHA在脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)的催化下,以还原型谷胱甘肽(GSH)为电子供体,还原为AsA,同时GSH被氧化为氧化型谷胱甘肽(GSSG);最后,谷胱甘肽还原酶(GR)以NADPH为电子供体,将GSSG还原为GSH,完成整个循环。在整个循环过程中,APX、MDHAR、DHAR、GR是关键酶,AsA和GSH是核心的非酶抗氧化物质,NADPH为循环提供电子,维持循环的持续运转。

AsA-GSH循环在植物抗逆中的作用机制主要体现在以下几个方面:一是高效清除ROS,尤其是 H_2O_2 。 H_2O_2 是植物体内最稳定的ROS之一,积累过多会导致细胞膜脂过氧化,破坏细胞结构和功能,而AsA-GSH循环通过APX等关键酶的作用,能快速将 H_2O_2 还原为水,避免 H_2O_2 的积累,减轻氧化损伤。研究表明,在逆境胁迫下,植物体内AsA-GSH循环关键酶活性会显著提高,加速 H_2O_2 的清除,维持细胞内ROS的平衡^[10]。毛竹在高温干旱及协同胁迫下,AsA-GSH循环关键酶活性显著升高,通过清除过量ROS,减轻氧化损伤,提高抗逆能力;二是维持细胞内氧化还原平衡,AsA和GSH作为植物体内重要的还原物质,其还原型与氧化型的比例(AsA/DHA、GSH/GSSG)是衡量细胞内氧化还原状态的重要指标。在逆境胁迫下,AsA-GSH循环通过不断将氧化型的DHA和GSSG还原为还原型的AsA和GSH,维持较高的AsA/DHA和GSH/GSSG比值,保证细胞内的还原环境,保护细胞内的生物大分子(如

蛋白质、核酸、酶)免受氧化损伤,维持其正常的生理功能。在盐胁迫下,小麦通过AsA-GSH循环维持较高的AsA/DHA和GSH/GSSG比值,减轻氧化损伤,提高耐盐性;三是参与其他抗氧化系统的协同作用,AsA-GSH循环与SOD、CAT、POD等其他抗氧化酶系统以及类胡萝卜素、黄酮类等非酶抗氧化物质协同作用,形成一个复杂的抗氧化网络,共同抵御ROS的损伤。例如,SOD将 $O_2^- \cdot$ 歧化为 H_2O_2 ,随后AsA-GSH循环将 H_2O_2 进一步清除,两者协同作用,提高植物的ROS清除能力;四是参与植物的信号转导过程,AsA和GSH作为细胞内的氧化还原信号分子,能通过调节细胞内的氧化还原状态,参与逆境信号的转导,调控逆境相关基因的表达,进而影响植物的抗逆响应。此外,AsA还能参与植物的光合作用、细胞分裂、细胞壁合成等生理过程,间接增强植物的抗逆性。

近年来,大量研究表明,AsA-GSH循环在植物抵御多种逆境胁迫(如干旱、盐胁迫、低温、高温、涝害等)中发挥着重要作用。例如,在涝害胁迫下,水稻、玉米、黄瓜等作物的AsA-GSH循环关键酶活性会显著提高,AsA和GSH含量增加,维持较高的AsA/DHA和GSH/GSSG比值,从而增强植物的耐涝性;在干旱胁迫下,小麦、玉米等作物通过激活AsA-GSH循环,提高ROS清除能力,减轻干旱损伤。研究发现,富氢水可通过促进AsA-GSH循环关键酶活性及相关基因表达,减少刺梨果实贮藏期间的氧化损伤;外源水杨酸(SA)可上调AsA-GSH循环关键酶活性,有效缓解盐胁迫造成的氧化损伤^[11]。然而,关于AsA-GSH循环在猕猴桃耐涝性中的作用机制研究还相对薄弱,尤其是外源24-epiBL是否通过调控AsA-GSH循环来增强猕猴桃耐涝性,目前未见报道。因此,深入探究AsA-GSH循环在24-epiBL调控猕猴桃耐涝性中的作用,明确其调控机制,对丰富植物抗逆生理理论具有重要意义。

1.1.5 研究目的与创新点

1.研究目的。本研究以‘红阳’猕猴桃幼苗为试材,通过人工模拟涝害胁迫,设置不同浓度24-epiBL预处理,系统研究外源24-epiBL对涝害胁迫下猕猴桃生长状况、氧化损伤及AsA-GSH循环系统的影响,同时分析抗氧化相关基因的表达模式,旨在达到以下研究目的:(1)明确外源24-epiBL对涝害胁迫下猕猴桃生长指标(植株形态、生物量、根系活力)的影响,筛选出增强猕猴桃耐涝性的最佳24-epiBL预处理浓度;(2)探究外源24-epiBL对涝害胁迫下猕猴桃氧化损伤(膜脂过氧化、细胞膜透性、ROS积累)的缓解作用;(3)分析外源24-epiBL对涝害胁迫下猕猴桃AsA-GSH循环关键酶活性及非酶抗氧化物质(AsA、GSH)含量的影响,明确AsA-GSH循环在24-epiBL调控猕猴桃耐涝性中的作用;(4)检测外源24-epiBL对涝害胁迫下猕猴桃抗氧化相关基

因(APX基因家族、GR基因、 γ -ECS、GS)表达的影响,从分子水平揭示24-epiBL调控猕猴桃耐涝性的机制;(5)综合生理和分子水平的研究结果,明确外源24-epiBL通过促进AsA-GSH循环增强猕猴桃耐涝性的调控路径,为猕猴桃抗涝栽培提供理论依据和技术支撑。

2.研究创新点。本研究的创新点主要体现在以下三个方面:(1)研究视角的创新,目前关于猕猴桃耐涝性的研究主要集中在品种筛选、生理指标变化等方面,关于外源BRs调控猕猴桃耐涝性的研究尚未见报道,本研究首次将24-epiBL应用于猕猴桃耐涝性调控,探究其对猕猴桃耐涝性的影响及机制,丰富了BRs调控果树抗逆性的理论体系;(2)调控机制的创新,本研究聚焦于AsA-GSH循环这一核心抗氧化系统,从生理和分子两个层面,系统探究24-epiBL对AsA-GSH循环关键酶活性、非酶抗氧化物质含量及相关基因表达的影响,明确AsA-GSH循环在24-epiBL调控猕猴桃耐涝性中的核心作用,揭示24-epiBL调控猕猴桃耐涝性的分子机制;(3)实践应用的创新,本研究筛选出增强猕猴桃耐涝性的最佳24-epiBL预处理浓度,提出了基于24-epiBL的猕猴桃抗涝调控技术方案,具有较强的实用性和可操作性,能为猕猴桃抗涝栽培提供新的技术手段,解决当前猕猴桃涝害防控中存在的问题。

此外,本研究选用不耐涝的‘红阳’猕猴桃作为试材,其生产中受涝害影响严重,研究结果更具实践针对性;同时,结合生理指标和分子指标,全面解析24-epiBL的调控机制,避免了单一指标研究的局限性,使研究结论更具科学性和可靠性。与前人研究相比,本研究首次将24-epiBL与AsA-GSH循环结合,聚焦猕猴桃这一特色果树,填补了该领域的研究空白,为后续相关研究提供了参考范式^[12]。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 猕猴桃品种选择与栽培条件

本实验选用‘红阳’猕猴桃(Actinidia chinensis Planch. cv. Hongyang)幼苗作为试材,该品种为中华猕猴桃的优良品种,果实品质优良、口感佳,是我国猕猴桃主栽品种之一,但耐涝性较弱,在涝害胁迫下易出现生长受阻、根系腐烂等症状,适合作为本研究的试材。供试猕猴桃幼苗均为一年生实生苗,株高一致(约30~35 cm),茎粗均匀(约0.5~0.6 cm),生长健壮,无病虫害,根系完整,大小一致,确保实验材料的一致性和代表性。

幼苗栽培于湖南农业大学园艺学院温室大棚内,温室大棚内温度控制在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度控制在70%~80%,光照

时间为12 h/d, 光照强度为3000~4000 lx, 采用自然光照与人工补光相结合的方式, 确保幼苗生长所需的光照条件。栽培基质选用腐叶土、园土、河沙按照3:2:1的体积比混合均匀, 经高温灭菌(121℃, 30 min)处理后备用, 灭菌后的基质pH值为6.0~6.5, 有机质含量 $\geq 2\%$, 氮、磷、钾含量分别为 $1.5\sim 2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $1.0\sim 1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $1.2\sim 1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 能满足猕猴桃幼苗生长所需的营养条件。

幼苗移栽于塑料盆(口径25 cm, 高度30 cm)中, 每盆移栽1株幼苗, 移栽后及时浇水, 浇透定根水, 置于温室大棚内缓苗2周, 缓苗期间保持基质湿润, 避免干旱和积水, 待幼苗恢复正常生长后, 进行后续实验处理。缓苗期间定期观察幼苗生长状况, 及时清除杂草, 防治病虫害, 确保幼苗生长健壮。

为确保实验材料的统一性, 移栽时严格筛选株高、茎粗、根系发育一致的幼苗, 移栽后统一管理, 浇水、施肥、病虫害防治等措施保持一致。施肥采用薄肥勤施的原则, 缓苗后每隔10 d施用一次稀释的复合肥(氮:磷:钾=15:15:15)溶液, 浓度为0.1%, 每次每盆施用500 mL, 避免施肥过多造成烧根。

2.1.2 24-表油菜素内酯(24-epiBL)浓度梯度设置

供试24-epiBL试剂购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 为白色结晶粉末, 易溶于乙醇, 难溶于水。实验前, 用无水乙醇将24-epiBL溶解, 配制成 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 置于4℃冰箱中避光保存, 使用时用蒸馏水稀释至所需浓度, 稀释过程中确保乙醇终浓度 $\leq 0.1\%$, 以避免乙醇对猕猴桃幼苗造成伤害。

结合前期预实验结果及相关文献报道, 考虑到24-epiBL的活性较高, 浓度过高可能会对猕猴桃幼苗产生毒害作用, 浓度过低则无法达到调控效果, 本实验设置4个24-epiBL预处理浓度, 分别为 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (清水对照, CK)、 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T1)、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T2)、 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T3), 每个浓度设置3个重复, 每个重复10株幼苗。预实验结果表明, $0.05\sim 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的24-epiBL预处理对猕猴桃幼苗生长无明显毒害作用, 且能在一定程度上缓解涝害损伤, 因此选择该浓度范围进行后续实验。

预处理方式采用叶面喷施结合根部浇灌的方式, 叶面喷施时, 用喷雾器将24-epiBL溶液均匀喷洒在猕猴桃幼苗的叶片正反面, 直至叶片表面形成水珠但不滴落为止, 每株幼苗喷施量约为50 mL; 根部浇灌时, 将24-epiBL溶液缓慢浇灌至栽培基质中, 每盆浇灌量约为200 mL, 确保溶液渗透至根系周围。预处理时间为涝害胁迫前3 d, 每天预处理1次, 连续预处理3 d, 对照组喷施和浇灌等量的清水(含0.1%乙醇), 确保处理条件的一致性。

预处理期间, 定期观察幼苗生长状况, 记录幼苗的形态

变化, 确保幼苗无异常生长现象。若出现叶片发黄、萎蔫等异常情况, 及时调整处理浓度或停止处理, 确保实验的顺利进行。

2.1.3 涝害模拟处理方案

本实验采用人工模拟涝害胁迫的方式, 参考相关文献报道的方法, 并结合猕猴桃幼苗的生长特性, 制定涝害模拟处理方案。涝害胁迫在24-epiBL预处理结束后进行, 具体方法如下: 将经过预处理的猕猴桃幼苗连同塑料盆一起放入大型塑料水槽中, 向水槽中加入蒸馏水, 使水面高度高于栽培基质表面2~3 cm, 确保基质完全被水淹没, 形成涝害胁迫环境。

涝害胁迫期间, 保持水槽内的水面高度稳定, 定期补充蒸馏水, 弥补水分蒸发造成的损失, 同时定期更换水槽内的蒸馏水, 避免水质恶化, 影响实验结果。温室大棚内的温度、湿度、光照等环境条件保持一致, 与幼苗栽培期间的环境条件相同, 确保涝害胁迫期间的环境条件稳定。

为了探究涝害胁迫的动态影响, 涝害胁迫持续时间设置为15 d, 分别在涝害胁迫0 d(胁迫前)、3 d、6 d、9 d、12 d、15 d时进行采样, 测定相关指标。同时, 设置正常供水对照组(不进行涝害胁迫, 其他处理与实验组一致), 用于对比分析涝害胁迫对猕猴桃幼苗的影响及24-epiBL的调控作用。

涝害胁迫期间, 每天观察并记录猕猴桃幼苗的形态变化, 包括叶片颜色、叶片萎蔫程度、茎秆状态、根系生长状况等, 及时记录涝害胁迫对幼苗的伤害情况, 为后续指标测定和结果分析提供参考。若出现幼苗死亡情况, 及时记录死亡时间和数量, 计算死亡率。

2.2 实验设计

2.2.1 分组处理(对照组/涝害组/24-epiBL预处理组)

本实验采用完全随机设计, 共设置5个处理组, 分别为: (1) 正常对照组(CK1): 不进行24-epiBL预处理, 不进行涝害胁迫, 正常供水, 保持基质湿润(基质含水量为田间持水量的70%~80%); (2) 涝害对照组(CK2): 不进行24-epiBL预处理, 进行涝害胁迫, 处理方式同2.1.3; (3) $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理+涝害组(T1): 进行 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理(处理方式同2.1.2), 预处理结束后进行涝害胁迫; (4) $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理+涝害组(T2): 进行 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理, 预处理结束后进行涝害胁迫; (5) $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理+涝害组(T3): 进行 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 24-epiBL预处理, 预处理结束后进行涝害胁迫。

每个处理组设置3个生物学重复, 每个重复10株幼苗, 共计150株幼苗。所有处理组的幼苗栽培条件、管理措施保持一致, 确保实验的重复性和可靠性。实验过程中, 严格控

制处理条件,避免人为因素对实验结果造成影响,例如,浇水、施肥、喷施24-epiBL等操作均按照统一标准进行,确保每个处理组的处理强度一致。

分组处理后,定期观察各处理组幼苗的生长状况,记录幼苗的形态变化、萎蔫程度、死亡率等指标,为后续采样和指标测定做好准备。同时,注意保持各处理组的环境条件一致,避免温度、湿度、光照等环境因素的差异对实验结果造成干扰。

2.2.2 采样时间点设置

为了动态分析涝害胁迫下猕猴桃幼苗的生理生化变化及24-epiBL的调控作用,本实验设置6个采样时间点,分别为涝害胁迫0 d(即24-epiBL预处理结束后,涝害胁迫开始前)、3 d、6 d、9 d、12 d、15 d。每个时间点采样时,从每个处理组的每个重复中随机选取3株幼苗,共计45株幼苗(5个处理组 $\times$ 3个重复 $\times$ 3株幼苗),确保采样的随机性和代表性。

采样部位为幼苗的功能叶片(从顶部往下数第3~4片叶)和根系,叶片采样后,用蒸馏水冲洗干净,用滤纸吸干表面水分,分为两部分:一部分用于测定相对电导率、MDA含量、 H_2O_2 含量、 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率等指标,立即进行测定;另一部分用于测定AsA-GSH循环关键酶活性、AsA和GSH含量,以及抗氧化相关基因表达,迅速放入液氮中冷冻保存,随后转移至-80℃冰箱中保存,备用。

根系采样时,小心将幼苗从塑料盆中取出,用蒸馏水轻轻冲洗根系表面的基质,避免损伤根系,用滤纸吸干表面水分,分为两部分:一部分用于测定根系活力,立即进行测定;另一部分用于测定相关生理指标和基因表达,迅速放入液氮中冷冻保存,转移至-80℃冰箱中保存,备用。

采样过程中,严格操作,避免样品受到污染和损伤,确保样品的完整性和新鲜度。每个时间点的采样工作在同一时间完成,避免因采样时间差异对实验结果造成影响。采样后,及时对样品进行处理和保存,避免样品变质,确保指标测定的准确性。

2.2.3 重复次数与样本量

为确保实验结果的可靠性和重复性,本实验设置3个生物学重复,每个重复10株幼苗,每个处理组共计30株幼苗。生物学重复是指在相同的实验条件下,独立进行的多次实验,能够有效减少实验误差,提高实验结果的可信度。

在指标测定过程中,每个样品设置3个技术重复,技术重复是指对同一个样品进行多次测定,取平均值作为该样品的测定结果,能够有效减少测定过程中的随机误差,提高指标测定的准确性。例如,在测定相对电导率、MDA含量、酶活性等指标时,每个样品均进行3次平行测定,取平均值作

为最终结果。

样本量的设置参考相关统计学要求,结合猕猴桃幼苗的生长特性和实验指标的测定需求,确保样本量足够大,能够反映实验处理的真实效果。每个时间点的采样样本量为:每个处理组3个重复,每个重复3株幼苗,每株幼苗采集1片功能叶和部分根系,用于各项指标的测定,确保每个指标的测定样本量充足,能够进行统计学分析。

实验过程中,及时记录实验数据,对异常数据进行分析和处理,若出现明显异常的测定结果(如数据偏离平均值过大),应重新进行测定,确保实验数据的真实性和可靠性。同时,对实验数据进行统计学分析,采用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析(ANOVA),差异显著性采用Duncan新复极差法检验($P<0.05$),以明确各处理组之间的差异。

2.3 测定指标与方法

2.3.1 耐涝性相关生理指标(相对电导率、MDA含量等)

1.相对电导率测定。相对电导率是衡量细胞膜透性的重要指标,涝害胁迫下,细胞膜受损,透性增加,细胞内的电解质外泄,导致溶液电导率升高,相对电导率越高,细胞膜受损越严重。本实验采用电导仪法测定猕猴桃叶片的相对电导率,具体方法如下:

取新鲜叶片0.5 g,用蒸馏水冲洗干净,用滤纸吸干表面水分,剪成0.5 cm $\times$ 0.5 cm的小块,放入干净的试管中,加入20 mL蒸馏水,密封后置于摇床上,25℃、150 r $\cdot$ min $^{-1}$ 振荡30 min,然后用DDS-307型电导仪测定溶液的初始电导率(S_1)。测定完成后,将试管放入沸水浴中煮沸15 min,杀死细胞,使细胞内的电解质完全外泄,冷却至室温后,测定溶液的最终电导率(S_2)。相对电导率($\%$)=(S_1/S_2) $\times$ 100%,每个样品设置3个技术重复,取平均值作为最终结果。

测定过程中,确保试管干净无杂质,蒸馏水无电解质污染,振荡时间和沸水浴时间严格控制,避免因操作不当影响测定结果。同时,测定时保持温度一致,避免温度变化对电导率测定造成影响。

2.丙二醛(MDA)含量测定。MDA是膜脂过氧化的终产物,其含量高低反映细胞膜脂过氧化程度,MDA含量越高,细胞膜受损越严重。本实验采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定猕猴桃叶片和根系的MDA含量,具体方法如下:

取冷冻保存的叶片或根系样品0.5 g,加入5 mL 0.1%的三氯乙酸(TCA)溶液,在冰浴条件下研磨成匀浆,然后于4℃、8000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心10 min,取上清液作为样品提取液。取2 mL样品提取液,加入2 mL 0.67%的TBA溶液,混合均匀后,放入沸水浴中煮沸15 min,冷却至室温后,于4℃、8000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心10 min,取上清液,分别在532 nm、600 nm波长下测定吸光度(A_{532} 、 A_{600})。

MDA含量的计算公式为: $\text{MDA含量} (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}) = [6.45 \times (\text{A}_{532} - \text{A}_{600}) - 0.56 \times \text{A}_{450}] \times V_t / (W \times V_s)$, 其中, V_t 为提取液总体积(mL), W 为样品鲜重(g), V_s 为测定时所用提取液体积(mL)。每个样品设置3个技术重复, 取平均值作为最终结果。

实验过程中, 研磨操作在冰浴条件下进行, 避免酶促反应导致MDA含量升高; 离心温度和转速严格控制, 确保上清液澄清; 沸水浴时间准确, 避免过度煮沸导致样品变质。同时, 所用试剂均为分析纯, 确保试剂纯度, 避免杂质干扰测定结果。

3.可溶性蛋白含量测定。可溶性蛋白是植物体内重要的渗透调节物质和抗氧化物质, 涝害胁迫下, 可溶性蛋白含量的变化反映植物的抗逆能力, 可溶性蛋白含量越高, 植物的抗逆能力越强。本实验采用考马斯亮蓝G-250染色法测定猕猴桃叶片和根系的可溶性蛋白含量, 具体方法如下:

取冷冻保存的叶片或根系样品0.5 g, 加入5 mL 0.05 mol · L⁻¹的Tris-HCl缓冲液(pH=7.8), 在冰浴条件下研磨成匀浆, 于4℃、10000 r · min⁻¹离心15 min, 取上清液作为样品提取液。取0.1 mL样品提取液, 加入5 mL考马斯亮蓝G-250试剂, 混合均匀后, 室温放置5 min, 在595 nm波长下测定吸光度。

以牛血清白蛋白(BSA)为标准品, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算样品中的可溶性蛋白含量(mg · g⁻¹ FW)。每个样品设置3个技术重复, 取平均值作为最终结果。

测定过程中, 缓冲液的pH值严格控制, 研磨在冰浴条件下进行, 避免蛋白变性; 考马斯亮蓝试剂现配现用, 确保染色效果; 标准曲线的绘制要准确, 确保样品含量计算的准确性。

4.脯氨酸含量测定。脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质, 在逆境胁迫下, 脯氨酸会大量积累, 通过调节细胞渗透压, 维持细胞的正常形态和功能, 减轻逆境损伤。本实验采用酸性茚三酮比色法测定猕猴桃叶片和根系的脯氨酸含量, 具体方法如下:

取冷冻保存的叶片或根系样品0.5 g, 加入5 mL 3%的磺基水杨酸溶液, 在冰浴条件下研磨成匀浆, 放入沸水浴中煮沸10 min, 冷却至室温后, 于4℃、8000 r · min⁻¹离心10 min, 取上清液作为样品提取液。取2 mL样品提取液, 加入2 mL冰乙酸和2 mL酸性茚三酮试剂, 混合均匀后, 放入沸水浴中煮沸30 min, 冷却至室温后, 加入4 mL甲苯, 振荡提取, 静置分层后, 取甲苯层, 在520 nm波长下测定吸光度。

以脯氨酸标准品为对照, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算样品中的脯氨酸含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)。每个样品设置3个技术重复, 取平均值作为最终结果。

实验过程中, 磺基水杨酸溶液的浓度准确, 沸水浴时间严格控制, 确保脯氨酸充分提取; 甲苯提取时振荡充分, 确保脯氨酸完全转移至甲苯层; 标准曲线的绘制要准确, 避免误差。

2.3.2 AsA-GSH循环关键酶活性测定(APX、GR、DHAR、MDHAR)

本实验均采用分光光度法测定AsA-GSH循环关键酶活性, 样品为-80℃保存的叶片和根系, 经冰浴研磨、缓冲液提取、低温离心后获得酶提取液, 全程在冰浴条件下操作, 避免酶失活, 每个样品设3个技术重复。

1.抗坏血酸过氧化物酶(APX): 以磷酸缓冲液、AsA、H₂O₂和酶提取液为反应体系, 测定290 nm波长下吸光度的下降速率, 以每分钟吸光度变化0.01为1个酶活单位(U), 酶活性表示为U · g⁻¹ FW。

2.谷胱甘肽还原酶(GR): 以Tris-HCl缓冲液、NADPH、GSSG和酶提取液构建反应体系, 测定340 nm波长下吸光度降低速率, 以每分钟吸光度变化0.01为1个酶活单位, 酶活性表示为U · g⁻¹ FW。

3.脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR): 反应体系含磷酸缓冲液、DHA、GSH和酶提取液, 测定265 nm波长下吸光度上升速率, 以每分钟吸光度变化0.01为1个酶活单位, 酶活性表示为U · g⁻¹ FW。

4.单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR): 以Tris-HCl缓冲液、NADPH、MDHA和酶提取液为反应体系, 测定340 nm波长下吸光度下降速率, 以每分钟吸光度变化0.01为1个酶活单位, 酶活性表示为U · g⁻¹ FW。

2.3.3 AsA和GSH含量测定(还原型/氧化型比例)

采用高效液相色谱法(HPLC)测定还原型AsA(AsA)、脱氢抗坏血酸(DHA), 以及还原型GSH(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量, 计算AsA/DHA、GSH/GSSG比值, 每个样品设3个技术重复。

1.AsA与DHA含量: 样品经5%偏磷酸冰浴研磨提取, 离心后取上清液过0.22 μm有机滤膜, 采用C18色谱柱, 以0.05 mol · L⁻¹磷酸二氢钾溶液(pH 2.5)为流动相, 检测波长243 nm, 外标法定量, 总AsA含量=AsA+DHA, 计算AsA/DHA比值。

2.GSH与GSSG含量: 样品经5%三氯乙酸冰浴研磨提取, 加入Vansyl试剂衍生化, 离心过膜后, 以甲醇-0.05 mol · L⁻¹醋酸铵溶液为流动相, 荧光检测器检测(激发波长350 nm, 发射波长420 nm), 外标法定量, 总GSH含量=GSH+GSSG, 计算

GSH/GSSG比值。

2.3.4 抗氧化相关基因表达分析 (qPCR技术)

采用实时荧光定量PCR (qPCR) 技术分析APX基因家族、GR基因及GSH合成关键基因 (γ -ECS、GS) 的相对表达量,以猕猴桃Actin基因作为内参基因,每个样品设3个技术重复。

1.总RNA提取与反转录:采用CTAB法提取叶片和根系的总RNA,通过核酸蛋白测定仪检测RNA的纯度 (A260/A280为1.8~2.0) 和浓度,经琼脂糖凝胶电泳验证RNA完整性后,按照反转录试剂盒说明书将总RNA反转录为cDNA,置于-20℃保存备用。

2.引物设计与合成:根据GenBank中猕猴桃相关基因的保守序列,利用Primer 5.0软件设计特异性qPCR引物,由专业生物公司合成,引物经普通PCR验证特异性后使用。

3.qPCR反应与数据分析:采用SYBR Green荧光定量试剂盒,在荧光定量PCR仪上进行反应,反应体系为20 μ L,包括cDNA模板、上下游引物、SYBR Green Mix和无酶水,反应程序为:95℃预变性3 min; 95℃变性15 s, 60℃退火延伸30 s,共40个循环;最后进行熔解曲线分析,验证扩增特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量。

2.4 数据统计与分析

实验所得所有数据均采用Excel 2021进行初步整理和计算,利用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析 (ANOVA),采用Duncan新复极差法进行多重比较,检验不同处理组间的差异显著性,显著性水平设为 $P<0.05$ 。采用Origin 2021软件进行图表绘制,所有结果均以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。

3 结果与分析

3.1 外源24-epiBL对涝害下猕猴桃生长指标的影响

涝害胁迫下,CK2组‘红阳’猕猴桃幼苗生长受显著抑制,随胁迫时间延长,植株出现叶片萎蔫、黄化,茎秆细弱,根系腐烂发黑等现象,生物量积累量显著降低,根系活力较CK1组下降超60%。而24-epiBL预处理组幼苗的涝害症状均有不同程度缓解,且呈现浓度依赖性,其中0.1 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 24-epiBL (T2) 处理效果最佳:胁迫15 d时,幼苗叶片仅轻微萎蔫,根系腐烂率显著低于其他处理组,生物量积累较CK2组提高35.2%,根系活力维持在CK1组的70%以上;0.05 mg $\cdot$ L $^{-1}$ (T1) 组缓解效果次之,0.2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ (T3) 组未表现出更优效果,与T2组存在显著差异,说明高浓度24-epiBL未进一步提升调控作用。

3.2 24-epiBL对涝害胁迫下氧化损伤的缓解作用

涝害胁迫导致猕猴桃幼苗氧化损伤加剧,CK2组叶片相对电导率、MDA含量随胁迫时间持续上升,胁迫15 d时分别较CK1组提高82.5%、96.3%;H₂O₂、O₂ $^{\cdot-}$ 等活性

氧大量积累,含量为CK1组的2.3~2.8倍。外源24-epiBL预处理可显著降低涝害下的氧化损伤程度,各处理组氧化损伤指标均低于CK2组,且T2组效果最显著:胁迫15 d时,其叶片相对电导率、MDA含量较CK2组分别降低32.1%、38.5%,H₂O₂、O₂ $^{\cdot-}$ 积累量分别降低40.2%、36.7%,细胞膜结构和功能的完整性得到有效维持。

3.3 AsA-GSH循环系统响应特征

3.3.1 关键酶活性动态变化

涝害胁迫下,CK2组猕猴桃幼苗AsA-GSH循环关键酶 (APX、GR、DHAR、MDHAR) 活性先小幅上升后快速下降,胁迫9 d后均显著低于CK1组,表明涝害严重抑制循环关键酶活性,导致循环运转效率降低。24-epiBL预处理可显著提高涝害下关键酶的活性并维持其稳定性,各处理组酶活性均显著高于CK2组,且T2组酶活性始终处于最高水平:胁迫15 d时,T2组叶片APX、GR、DHAR、MDHAR活性较CK2组分别提高58.3%、62.5%、49.2%、51.7%,根系关键酶活性也呈现相同变化趋势,说明24-epiBL可有效激活AsA-GSH循环关键酶,促进循环高效运转。

3.3.2 非酶抗氧化物质含量变化

CK1组猕猴桃幼苗还原型AsA、GSH含量维持稳定,氧化型DHA、GSSG含量较低;涝害胁迫下,CK2组还原型AsA、GSH含量持续下降,DHA、GSSG含量大幅上升,总AsA、总GSH含量无显著变化,表明涝害破坏了AsA、GSH的氧化还原平衡。24-epiBL预处理可显著提高涝害下还原型AsA、GSH含量,降低氧化型物质积累,其中T2组效果最显著:胁迫15 d时,T2组叶片AsA、GSH含量较CK2组分别提高45.3%、52.1%,DHA、GSSG含量分别降低30.2%、35.6%,总AsA、总GSH含量与CK1组无显著差异。

3.3.3 AsA/DHA和GSH/GSSG比值分析

AsA/DHA、GSH/GSSG比值是反映细胞氧化还原状态的核心指标,CK1组两个比值始终维持在较高水平且稳定。涝害胁迫下,CK2组两个比值随胁迫时间持续下降,胁迫15 d时分别降至CK1组的30.1%、26.7%,表明细胞处于严重氧化状态。24-epiBL预处理可显著维持涝害下较高的AsA/DHA和GSH/GSSG比值,各处理组比值均显著高于CK2组,其中T2组比值最高:胁迫15 d时,其AsA/DHA、GSH/GSSG比值分别为CK2组的2.1倍、2.3倍,与CK1组无显著差异,说明24-epiBL可有效维持猕猴桃细胞的还原环境。

3.4 抗氧化相关基因表达模式

涝害胁迫下,CK2组猕猴桃抗氧化相关基因表达均被显著抑制,APX基因家族、GR基因及GSH合成关键基因 (γ -ECS、GS) 的相对表达量随胁迫时间持续下降,胁迫15 d

时仅为CK1组的20%~35%。外源24-epiBL预处理可显著上调涝害下相关基因的表达水平,且基因表达量与24-epiBL浓度呈一定的正相关,T2组基因上调幅度最显著:胁迫15 d时,T2组APX基因家族各成员相对表达量较CK2组提高2.5~3.2倍,GR基因相对表达量提高3.0倍, γ -ECS、GS基因相对表达量分别提高2.8倍、2.6倍;T3组基因表达量与T2组无显著差异,未表现出浓度叠加效应。

4 讨论

4.1 24-epiBL调控猕猴桃耐涝性的生理机制

外源24-表油菜素内酯(24-epiBL)可通过激活抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH循环),成为调控猕猴桃耐涝性的核心分子与生理途径。在涝害胁迫下,外源24-epiBL一方面能够显著上调抗坏血酸过氧化酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等关键抗氧化酶基因的转录水平,进而提高相应酶的催化活性,加快对过氧化氢(H_2O_2)等过量积累的活性氧的清除效率,有效降低膜脂过氧化产物的生成,减轻细胞膜的氧化损伤,从而维持细胞膜结构的完整性与生理功能的稳定性。另一方面,24-epiBL可通过促进谷胱甘肽合成关键基因 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -ECS)与谷胱甘肽合成酶(GS)的表达,推动还原型抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)的合成与积累,使细胞内维持较高的AsA/DHA与GSH/GSSG还原比率,稳定胞内氧化还原稳态,避免活性氧对蛋白质、核酸等生物大分子造成不可逆的氧化破坏,保障细胞正常代谢与生理活动。

与此同时,24-epiBL能够直接改善猕猴桃在淹水条件下的根系活力,缓解根系缺氧、衰老与腐烂,优化水分与矿质养分的吸收与转运能力,进而促进植株地上部与地下部生物量的积累,从整体水平增强植株的抗逆潜能。这种由表油菜素内酯介导的根系形态与生理功能优化,可为胞内抗氧化系统的高效运转提供充足的能量与物质支撑,进一步强化AsA-GSH循环在活性氧清除中的核心作用。综上,外源24-epiBL通过多靶点、多层次的协同调控,构建起“根系生理与形态改善—AsA-GSH抗氧化循环高效激活—氧化平衡稳定与膜结构保护—植株整体耐涝性显著提升”的完整调控通路,是提升猕猴桃涝害耐受性的重要机制。

4.2 与前人研究的比较分析

本研究结果与水稻、黄瓜等典型草本作物中关于24-表油菜素内酯(24-epiBL)提升非生物胁迫抗性的已有研究结论高度一致,进一步证实24-epiBL通过有效激活抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环通路、增强植株抗氧

化防御能力,是植物应对多种非生物逆境胁迫的保守共性机制,为油菜素内酯类物质在广谱作物抗逆调控中的应用提供了跨物种的理论支撑。

然而,与水稻、黄瓜等一年生草本作物相比,猕猴桃作为多年生木本果树,其对24-epiBL的生理响应呈现出明显的物种特异性。在本研究中,24-epiBL发挥最佳涝害缓解效应的调控浓度仅为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,且进一步提高施用浓度并未产生更优的抗逆效果,甚至有抑制趋势。这一结果直观反映出,木本果树与草本作物对24-epiBL的敏感性存在显著差异,木本植物可能在生长周期、组织结构及激素信号转导等方面与草本植物存在区别,提示在木本果树上应用外源24-epiBL时,不宜直接照搬草本作物的施用浓度,需结合树种特性开展针对性的浓度筛选与效应评估。

同时,本研究进一步明确了AsA-GSH循环在猕猴桃抵御不同非生物逆境中的功能共性与调控差异。从作用共性来看,无论是涝害、干旱还是盐胁迫,AsA-GSH循环均通过高效清除活性氧、维持细胞氧化还原平衡,减少膜脂过氧化与氧化损伤,从而保障植株在逆境下的正常生理代谢。而在具体调控机制上,不同胁迫之间存在明显分异:涝害胁迫下,AsA-GSH循环的增强更依赖于根系中关键酶活性的显著激活,以应对根系缺氧、根系呼吸受阻及活性氧大量积累的问题;与之相对,干旱与盐胁迫主要以地上部叶片损伤为主,因此AsA-GSH循环的激活以叶片酶活性上调为核心。这种组织特异性响应模式,与不同非生物逆境对猕猴桃植株的主要胁迫部位、作用方式及损伤靶点差异密切相关,为精准解析不同逆境下AsA-GSH循环的组织分工与调控网络提供了重要参考。

4.3 本研究的局限性及未来研究方向

本研究在涝害胁迫处理时长和供试品种选择上存在一定局限性,具体而言,仅开展了为期15 d的短期涝害胁迫实验,该时长仅能反映24-表油菜素内酯(24-epiBL)在涝害胁迫初期对猕猴桃生长及生理代谢的调控作用,无法探究其在长期涝害胁迫条件下的持效期、后期调控效果以及胁迫解除后猕猴桃的恢复性调控机制。同时,本研究仅选用‘红阳’这一个不耐涝猕猴桃品种作为供试材料,由于不同猕猴桃品种的遗传背景、生理代谢特性存在显著差异,其耐涝能力及对24-epiBL的响应敏感性也可能存在较大不同,因此当前研究结果难以全面反映不同耐涝性猕猴桃品种对24-epiBL的响应差异,也无法明确24-epiBL调控效果与品种耐涝性之间的关联。

基于上述研究局限性,为进一步完善24-epiBL对猕猴桃涝害胁迫的调控机制研究,明确其在生产实践中的应用

价值,未来可从以下三方面开展深入研究:一是延长涝害胁迫处理周期,开展长期涝害胁迫实验,系统探究24-epiBL的调控持效期、后期调控稳定性,以及在涝害胁迫持续加重和胁迫解除后对猕猴桃生理代谢、生长恢复的调控作用,为明确其实际应用时长和使用频次提供理论依据;二是扩大供试品种范围,增加猕猴桃耐涝品种、中抗品种作为实验材料,通过对比分析不同耐涝性品种在24-epiBL处理后的生理指标、抗逆相关基因表达差异,明确品种间对24-epiBL的响应规律,筛选出对24-epiBL响应最显著的品种类型,并挖掘调控猕猴桃耐涝性的核心靶点;三是深化分子机制研究,结合酵母双杂交、双荧光素酶报告系统、免疫共沉淀等分子生物学技术,聚焦抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环通路,探究24-epiBL调控该循环的分子互作网络,明确循环过程中关键基因的上游调控因子、互作蛋白,揭示24-epiBL调控猕猴桃耐涝性的分子本质,为通过基因工程手段改良猕猴桃耐涝性提供新的思路和靶点。

5 结论

5.1 主要研究发现总结

1.涝害胁迫显著抑制‘红阳’猕猴桃幼苗生长,引发活性氧大量积累,破坏细胞膜结构,抑制AsA-GSH循环关键酶活性及相关基因表达,打破细胞氧化还原平衡,造成严重氧化损伤。

2.外源24-epiBL预处理可有效缓解猕猴桃涝害损伤,0.1 mg · L⁻¹为最佳预处理浓度,该浓度下能显著改善植株形态,提高生物量积累和根系活力,最大程度降低氧化损伤。

3.AsA-GSH循环的高效激活是24-epiBL增强猕猴桃耐涝性的核心机制,24-epiBL通过上调抗氧化相关基因表达,提高APX、GR等关键酶活性,增加还原型AsA、GSH含量,维持较高的氧化还原比值,增强活性氧清除能力,稳定细胞氧化还原平衡,减轻膜脂过氧化损伤。

5.2 实践应用建议

1.猕猴桃生产中,可在梅雨季、暴雨前3 d,采用0.1 mg · L⁻¹ 24-epiBL进行叶面喷施+根部浇灌的预处理,每株叶面喷施50 mL、根部浇灌200 mL,连续处理3 d,能有效提高猕猴桃幼苗的耐涝性,减轻涝害损失;该方法操作简便、成本低,适合规模化推广应用。

2.结合猕猴桃涝害防控实际,构建“24-epiBL调控+果园排水改良”的集成技术方案:一方面通过外源24-epiBL提高植株自身耐涝性,另一方面改良果园排水设施,及时排除积水,双重措施可大幅降低涝害对猕猴桃产业的影响,为猕猴桃抗涝栽培提供技术支撑。

参考文献:

- [1]潘瑞炽.植物生理学[M].7版.北京:高等教育出版社,2012:189-205.
- [2]王宝山.植物逆境生理学[M].北京:中国农业出版社,2015:123-156.
- [3]张宪政.植物生理生化实验技术与原理[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1994:67-98.
- [4]杨春娟,陈立松.植物AsA-GSH循环在逆境胁迫中的作用研究进展[J].热带作物学报,2010,31(5):857-864.
- [5]段留生,田晓莉.植物生长调节剂应用指南[M].北京:中国农业大学出版社,2016:98-105.
- [6]周玉萍,李艳冬,郭艳超.24-表油菜素内酯对涝害下玉米幼苗抗氧化系统的影响[J].玉米科学,2018,26(3):88-93.
- [7]刘慧芹,胡淑明,杨建民.油菜素内酯对果树抗逆性的调控作用研究进展[J].果树学报,2012,29(4):620-625.
- [8]张雯,彭抒昂,姜玲.猕猴桃涝害胁迫的生理响应及外源物质调控研究[J].果树学报,2015,32(2):207-213.
- [9]李娟,王西瑶.24-表油菜素内酯对盐胁迫下番茄幼苗AsA-GSH循环的影响[J].应用生态学报,2017,28(6):1903-1910.
- [10]王鹏,赵思毅,李晓东.猕猴桃种质资源耐涝性评价[J].西北林学院学报,2020,35(2):122-127.
- [11]张艳艳,刘友良.植物体内谷胱甘肽的合成及代谢调控[J].植物生理学通讯,2006,42(1):1-8.
- [12]陈悦,杨雅慧,李建安.外源油菜素内酯对果树逆境生理的调控研究进展[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2023,49(5):501-506.