

外源褪黑素通过激活 SOD 和 APX 级联反应缓解辣椒幼苗高温伤害

吴秀玲

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 为明确外源褪黑素 (Melatonin, MT) 对辣椒幼苗高温伤害的缓解效应及内在机制, 以辣椒品种‘辽椒15号’为试验材料, 设置对照组 (CK, 25℃/20℃昼夜间温)、高温胁迫组 (HT, 42℃/35℃昼夜间温)、褪黑素预处理+高温组 (MT+HT, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT预处理24h后进行高温胁迫), 测定幼苗形态、生理生化及分子指标, 探究MT对高温下辣椒幼苗抗氧化系统的调控作用。结果表明: 高温胁迫显著抑制辣椒幼苗生长, 导致株高、鲜重、干重及叶面积显著下降, 叶片出现严重萎蔫, 存活率降低; 同时, 高温诱导叶片膜脂过氧化加剧, 丙二醛 (MDA) 含量、过氧化氢 (H_2O_2) 积累量及细胞膜透性显著升高, 抗氧化酶 (SOD、APX、CAT、POD) 活性及SOD、APX基因表达量虽有一定上升, 但仍无法有效清除活性氧 (ROS), 光合参数 (气孔导度、净光合速率) 显著下降。与高温组相比, MT预处理可显著改善辣椒幼苗生长状况, 提高株高、生物量及叶面积, 降低叶片萎蔫程度, 提升存活率; 显著降低MDA含量、 H_2O_2 积累量及细胞膜透性, 显著提升SOD、APX活性 (分别较HT组升高38.62%、45.37%), 同时上调SOD、APX基因表达量 (分别较HT组上调2.13倍、2.87倍), CAT、POD活性也呈现协同升高趋势, 进而恢复光合能力。相关性分析显示, SOD、APX基因表达量与酶活性呈显著正相关, 与MDA含量、 H_2O_2 积累量呈显著负相关。综上, 外源褪黑素可通过激活SOD和APX级联反应, 协同调控其他抗氧化酶活性, 增强辣椒幼苗对ROS的清除能力, 减轻膜脂过氧化损伤, 恢复光合功能, 从而缓解高温胁迫对辣椒幼苗的伤害。本研究为辣椒高温胁迫防控及褪黑素在设施辣椒栽培中的应用提供理论依据和技术支撑。

关键词: 辣椒幼苗; 高温胁迫; 褪黑素; SOD; APX; 抗氧化系统; 膜脂过氧化

中图分类号: S641.3

文献标识码: A

文章编号: 3106-2547 (2025) 06-0013-11

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.06.002

Exogenous Melatonin Alleviates High Temperature Damage in Pepper Seedlings by Activating SOD and APX Cascade Reaction

Wu Xiuling

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

Abstract: To clarify the alleviating effect and internal mechanism of exogenous melatonin (MT) on high temperature damage in pepper seedlings, pepper variety ‘Liaojiao 15’ was used as the test material. Three treatments were set: control group (CK, day/night temperature 25℃/20℃), high temperature stress group (HT, day/night temperature 42℃/35℃), and melatonin pretreatment + high temperature group (MT+HT, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT pretreatment for 24h followed by high temperature stress). Morphological, physiological, biochemical and molecular indexes of seedlings were determined to explore the regulatory effect of MT on the antioxidant system of pepper seedlings under high temperature. The results showed that high temperature stress significantly inhibited the growth of pepper seedlings, leading to a significant decrease in plant height, fresh weight, dry weight and leaf area, severe wilting of leaves and reduced survival rate. At the same time, high temperature induced the aggravation of leaf membrane lipid peroxidation, the contents of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation and cell membrane permeability increased significantly. Although the activities of antioxidant enzymes (SOD, APX, CAT, POD) and the expression levels of SOD and APX genes increased to a certain extent, they still could not effectively scavenge reactive oxygen species (ROS), and the photosynthetic parameters (stomatal conductance, net photosynthetic rate) decreased significantly. Compared with the HT group, MT pretreatment could significantly improve the growth status of pepper seedlings, increase plant height, biomass and leaf area, reduce leaf wilting degree, and improve survival rate; it significantly reduced MDA content, H_2O_2 accumulation and cell membrane permeability, significantly increased SOD and APX activities (38.62% and 45.37% higher than those in the HT group, respectively), and simultaneously up-regulated the expression levels of SOD and APX genes (2.13 times and 2.87 times higher than those in the HT group, respectively). The activities of CAT and POD also showed a synergistic increase trend, thereby restoring photosynthetic

作者简介: 吴秀玲, 博士, 教授, 研究方向为设施蔬菜栽培与生理。

capacity. Correlation analysis showed that the expression levels of SOD and APX genes were significantly positively correlated with enzyme activities, and significantly negatively correlated with MDA content and H_2O_2 accumulation. In conclusion, exogenous melatonin can activate the SOD and APX cascade reaction, synergistically regulate the activities of other antioxidant enzymes, enhance the ROS scavenging capacity of pepper seedlings, reduce membrane lipid peroxidation damage, restore photosynthetic function, and thus alleviate the damage of high temperature stress to pepper seedlings. This study provides a theoretical basis and technical support for the prevention and control of high temperature stress in pepper and the application of melatonin in protected pepper cultivation.

Keywords: pepper seedlings; high temperature stress; melatonin; SOD; APX; antioxidant system; membrane lipid peroxidation

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 全球气候变暖对辣椒种植的挑战

全球气候变暖已成为 21 世纪人类社会与自然生态系统共同面临的最严峻环境问题之一。政府间气候变化专门委员会 (IPCC) 多次评估报告指出, 近百年来全球地表平均气温呈现持续上升趋势, 极端高温事件的发生频率、持续时间与影响范围均显著增加, 对全球粮食安全、蔬菜生产与农业可持续发展构成了前所未有的威胁^[1]。在设施农业与露地栽培并重的生产体系下, 高温、干旱、强光等非生物胁迫已成为限制作物产量与品质的主要环境因子。

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 隶属于茄科 (Solanaceae) 辣椒属, 为一年生或有限多年生草本植物, 是我国栽培面积最广、消费量最大的蔬菜作物之一, 兼具鲜食、加工、药用与经济价值。其果实富含维生素 C、维生素 E、类胡萝卜素、辣椒素、多酚等多种生物活性物质, 不仅是日常饮食中重要的调味品与营养来源, 也在食品工业、医药保健等领域具有广阔应用前景。我国辣椒产业规模庞大, 在蔬菜产业结构调整、农民增收与乡村振兴中占据重要地位^[2]。

从生理特性来看, 辣椒属于典型喜温、不耐热作物, 其营养生长与生殖发育的最适温度区间为 20~30℃。当环境温度持续超过 35℃时, 植株即表现出明显的高温胁迫响应; 而在夏季设施栽培条件下, 棚室密闭环境易造成高温、高湿、强光叠加, 棚内温度常迅速攀升至 40℃以上, 远超辣椒正常生长的温度阈值, 进而引发一系列生长异常与生理代谢紊乱。高温胁迫不仅会抑制辣椒幼苗生长、降低成株长势, 还会导致开花授粉受阻、落花落果加重、果实畸形率上升、商品品质下降, 严重时甚至造成大面积减产甚至绝收。

随着全球气候变暖进程不断加剧, 夏季极端高温天气呈现常态化趋势, 高温胁迫对辣椒生产的负面影响日益突出。如何通过安全、高效、环境友好型的调控手段, 缓解高温对辣椒生长发育的伤害, 提升辣椒耐热性, 保障辣椒生产的稳产、优质与高效, 已成为当前设施园艺与蔬菜抗逆栽培领域亟待解决的重要科学问题与生产实际需求^[3]。

1.1.2 高温胁迫对辣椒幼苗生长的危害 (如膜脂过氧化、光合抑制等)

辣椒幼苗期是植株从异养转向自养、构建光合系统与根系结构的关键时期, 对温度、光照、水分等环境因子高度敏感, 抗逆能力较弱, 是高温胁迫的敏感期。高温可通过影响细胞结构、生理代谢、基因表达等多个层面, 对辣椒幼苗产生系统性伤害, 最终表现为生长受阻、素质下降、存活率降低。

在形态生长层面, 持续高温会抑制幼苗顶端分生组织活性, 干扰细胞伸长与细胞分裂进程, 导致株高增长迟缓、茎秆纤细瘦弱、根系发育不良; 同时高温会加速叶片衰老, 引发叶绿素降解, 表现为叶片黄化、萎蔫、皱缩、焦枯, 叶面积显著减小, 植株鲜重、干重、根冠比等生物量指标大幅下降。高温胁迫越严重, 上述伤害越明显, 严重时可导致整株失水、枯死, 直接降低育苗成活率与壮苗率, 为后期栽培埋下隐患^[4]。

在生理生化层面, 高温最直接的后果是诱发植物体内氧化爆发。正常生长条件下, 植物细胞内活性氧 (ROS) 的产生与清除处于动态平衡; 而高温胁迫会打破这一平衡, 导致超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($\cdot OH$) 等 ROS 大量积累^[5]。过量 ROS 具有强细胞毒性, 可攻击蛋白质、核酸、脂质等生物大分子, 引发膜脂过氧化反应, 破坏生物膜的流动性与完整性, 导致细胞膜透性急剧增加, 细胞内电解质、可溶性糖、氨基酸等物质大量外渗。丙二醛 (MDA) 作为膜脂氧化的终产物, 其积累量常被作为评价细胞膜损伤程度与逆境伤害强弱的重要指标。

此外, 高温对光合作用系统具有显著破坏作用。高温会导致叶绿体结构膨胀、类囊体片层紊乱, 降解叶绿素与类胡萝卜素, 降低光合色素含量; 同时抑制 Rubisco 等关键光合酶活性, 导致气孔关闭或气孔导度下降, CO_2 供应不足, 光反应与暗反应过程受阻, 净光合速率、蒸腾速率、表观量子效率等光合参数显著降低, 光合产物合成与转运减少, 进一步抑制幼苗生长。

同时, 高温还会干扰内源激素平衡、抑制氮代谢与碳代谢、诱导渗透调节物质失衡, 使植株整体代谢紊乱, 抗逆能

力进一步下降,形成“高温—氧化损伤—代谢紊乱—生长抑制”的恶性循环^[6]。

1.1.3 褪黑素在植物抗逆中的功能研究进展

褪黑素(Melatonin, MT, 化学名为N-乙酰基-5-甲氧基色胺)是一种广泛存在于生物体内的吲哚类小分子化合物,最早在动物松果体中被发现,因其具有调节昼夜节律、改善睡眠、抗氧化、抗炎、神经保护等功能而被广泛研究^[7]。随着植物生理学与分子生物学的发展,研究者相继在水稻、小麦、拟南芥、番茄、黄瓜、辣椒等多种植物中检测到褪黑素的存在,并证实其作为一种新型植物内源激素/生长调节物质,参与调控植物种子萌发、根系发育、开花结果、叶片衰老等多个生长发育过程。

近年来,褪黑素在植物非生物胁迫应答中的重要作用逐渐成为研究热点。大量研究表明,褪黑素具有极强的直接抗氧化能力,可作为抗氧化剂直接清除超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基等多种ROS;同时,褪黑素还可通过信号传导途径,上调植物体内抗氧化酶系统与非酶抗氧化物质的合成,增强植株整体抗氧化防御能力,从而减轻膜脂过氧化损伤,保护细胞膜、叶绿体、线粒体等细胞器结构与功能的完整性。

在高温胁迫领域,外源褪黑素调控作物耐热性已在多种作物上得到验证。研究发现,适宜浓度的褪黑素预处理可有效缓解高温胁迫下小麦、番茄、黄瓜、玉米、白菜等作物的生长抑制,通过提高SOD、POD、CAT、APX等抗氧化酶活性,降低MDA含量与ROS水平,维持光合系统稳定,改善渗透调节能力,从而提升植株高温耐受性。

然而,在辣椒耐热性调控方面,褪黑素的研究仍相对薄弱,尤其在幼苗期高温胁迫下,褪黑素对辣椒生长、膜稳定性、光合系统及抗氧化系统的调控效应尚不系统;其内在作用机制,特别是是否通过调控关键抗氧化酶的级联反应发挥功能,仍缺乏直接试验证据与深入解析,这也为本研究提供了重要切入点与研究空间。

1.1.4 SOD和APX在抗氧化防御中的核心作用

当植物遭受高温、干旱、盐渍等逆境胁迫时,细胞内会迅速积累大量活性氧(ROS),若不能被及时、高效清除,将引发氧化损伤,甚至导致细胞凋亡。植物在长期进化过程中形成了一套完善的抗氧化防御系统,主要包括酶促抗氧化系统与非酶促抗氧化系统,其中酶促系统在ROS清除中发挥主导作用^[8]。

超氧化物歧化酶(SOD)与抗坏血酸过氧化物酶(APX)是植物抗氧化酶系统中的核心关键酶,二者协同作用,构成了ROS清除的重要级联反应通路。

SOD位于抗氧化防御的第一道防线,能够特异性催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应,生成氧气(O_2)和过氧化氢(H_2O_2),从而快速降低超氧阴离子对细胞的毒性。

但 H_2O_2 仍具有较强氧化性,若大量积累仍会对细胞造成伤害,此时APX作为清除 H_2O_2 的关键酶,以抗坏血酸(AsA)为电子供体,将 H_2O_2 还原为水(H_2O)和氧气,避免其进一步生成毒性更强的羟基自由基($\cdot OH$)。

因此,SOD-APX级联反应是植物高效清除ROS、维持氧化还原平衡的核心环节。大量研究证实,SOD与APX的活性水平、蛋白含量及基因表达量与植物抗逆性呈显著正相关^[9]。在高温胁迫下,耐热性强的材料通常能更快、更强地激活SOD与APX表达,提高酶活性,从而减轻氧化损伤,维持植株正常生长。

目前,褪黑素是否通过调控SOD和APX的酶活性与基因表达,激活这一关键抗氧化级联反应,进而提升辣椒幼苗的高温耐受性,尚未见系统报道。深入揭示这一机制,对于阐明褪黑素调控辣椒耐热性的分子生理基础具有重要理论价值。

1.2 研究目的与假设

1.2.1 明确外源褪黑素对辣椒幼苗高温耐受性的影响

本研究以设施主栽辣椒品种幼苗为试验材料,模拟夏季生产中常见的高温胁迫环境,通过设置常温对照、高温胁迫、外源褪黑素预处理+高温胁迫等不同处理组,系统测定辣椒幼苗生长形态指标(株高、茎粗、鲜重、干重、叶面积、壮苗指数)、膜脂过氧化指标(相对电导率、MDA含量、ROS积累量)、抗氧化酶活性、光合气体交换参数及幼苗存活率等,系统评价外源褪黑素对高温胁迫下辣椒幼苗生长与生理状态的调控效应,明确褪黑素能否有效缓解高温伤害、提升辣椒幼苗高温耐受性,筛选适宜的调控方式,为褪黑素在辣椒抗高温栽培中的实际应用提供科学依据与技术参考^[10]。

1.2.2 验证褪黑素是否通过调控SOD和APX级联反应缓解高温伤害

基于现有研究基础与植物抗氧化防御理论,本研究提出科学假设:

外源褪黑素可通过激活SOD-APX抗氧化级联反应,上调SOD、APX相关基因的转录水平,提高SOD与APX酶活性,协同增强CAT、POD等抗氧化酶功能,高效清除高温诱导积累的ROS,减轻膜脂过氧化损伤,保护叶绿体结构与光合系统功能,最终缓解高温对辣椒幼苗的生长抑制,提升高温耐受性。

为验证上述假设,本研究将重点测定不同处理下辣椒幼

苗SOD、APX的活性变化与基因相对表达量,并结合膜脂过氧化、光合参数、ROS含量等指标进行相关性分析与通路分析,从生理与分子水平揭示褪黑素缓解辣椒高温伤害的内在机制,为深入理解蔬菜作物耐热调控网络提供新的理论支持^[11]。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 辣椒品种选择与种子处理

试验选用生产上广泛种植、高温敏感性中等的辣椒品种‘辽椒15号’(由沈阳农业大学园艺学院辣椒育种课题组提供)。选取颗粒饱满、大小均匀、无病虫害的种子,先用55℃温水浸种15min(不断搅拌),然后用蒸馏水冲洗3~4次,再用0.1%的HgCl₂溶液消毒10min,消毒后用蒸馏水冲洗干净,置于25℃恒温培养箱中浸种24h,待种子吸胀后,播于装有育苗基质(草炭:蛭石:珍珠岩=2:1:1,提前灭菌)的育苗盘(50孔)中,每孔播1粒种子,置于人工气候箱中培养,培养条件为:昼温25℃、夜温20℃,光照时长12h·d⁻¹,光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度70%~80%,定期浇水,保持基质湿润,待幼苗长至4~5片真叶时,选取生长整齐一致的幼苗进行试验处理。

2.1.2 褪黑素浓度梯度设置

参考前人关于褪黑素在植物抗高温胁迫中的应用浓度,结合预实验结果,设置褪黑素(纯度≥98%,Sigma公司)浓度梯度为0 μmol·L⁻¹(CK、HT组)、50 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹、150 μmol·L⁻¹、200 μmol·L⁻¹,其中100 μmol·L⁻¹为最优预处理浓度(预实验中该浓度下辣椒幼苗高温耐受性最强),用于后续正式试验。褪黑素溶液用少量无水乙醇溶解后,用蒸馏水定容至所需浓度,现配现用。

2.1.3 高温处理条件

高温胁迫处理在人工气候箱中进行,设置高温胁迫条件为:昼温42℃、夜温35℃,光照时长12h·d⁻¹,光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度70%~80%,持续高温胁迫7d,期间定期浇水,保持基质湿润,避免干旱胁迫干扰试验结果。对照组(CK)保持正常培养条件(昼温25℃、夜温20℃),其他条件与高温处理组一致。

2.2 实验设计

2.2.1 分组处理:对照组、高温组、褪黑素预处理+高温组

试验共设置3个处理组,每个处理组3个重复,每个重复30株幼苗,具体处理如下:

对照组(CK):幼苗正常培养,不进行高温胁迫,也

不进行褪黑素预处理,全程保持昼温25℃、夜温20℃的培养条件,培养7d。

高温组(HT):幼苗正常培养至4~5片真叶后,直接进行高温胁迫(昼温42℃、夜温35℃),持续7d,期间不进行褪黑素处理^[12]。

褪黑素预处理+高温组(MT+HT):幼苗正常培养至4~5片真叶后,用100 μmol·L⁻¹的褪黑素溶液进行叶面喷施,喷施量以叶片完全湿润且滴落为宜,预处理24h后,进行高温胁迫(昼温42℃、夜温35℃),持续7d,期间不再喷施褪黑素。

所有处理组在培养期间,管理条件保持一致,定期观察幼苗生长状况,记录叶片萎蔫情况。

2.2.2 重复次数与样本量

每个处理组设置3个生物学重复,每个重复选取30株生长整齐一致的辣椒幼苗,确保样本的代表性和试验结果的可靠性。在高温胁迫7d后,每个重复随机选取10株幼苗进行形态指标、生理指标的测定;选取5株幼苗进行分子指标(SOD、APX基因表达量)的测定;剩余15株幼苗用于存活率统计。

2.3 测定指标与方法

2.3.1 形态指标:株高、鲜重、干重、叶面积

高温胁迫7d后,每个重复随机选取10株幼苗,采用直尺测定株高(从地表至生长点顶端的垂直距离,精确到0.1cm);采用电子天平(精度0.001g)测定幼苗地上部鲜重,随后将幼苗置于105℃烘箱中杀青30min,再在80℃烘箱中烘干至恒重,测定地上部干重^[13];采用叶面积仪(LI-3000C,美国LI-COR公司)测定每株幼苗的总叶面积,计算平均值。

2.3.2 生理指标

高温胁迫7d后,每个重复随机选取10株幼苗,取幼苗功能叶(第3~4片真叶),去除叶脉,剪碎后混合均匀,用于生理指标测定,所有指标均采用试剂盒法测定,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,具体测定方法参照试剂盒说明书。

抗氧化酶活性:SOD、APX、CAT、POD。SOD活性采用氮蓝四唑(NBT)光还原法测定,以抑制NBT光还原50%所需酶量为1个酶活性单位(U·g⁻¹FW);APX活性采用紫外分光光度法测定,以每分钟A₂₉₀下降0.1所需酶量为1个酶活性单位(U·g⁻¹FW);CAT活性采用紫外分光光度法测定,以每分钟A₂₄₀下降0.1所需酶量为1个酶活性单位(U·g⁻¹FW);POD活性采用愈创木酚法测定,以每分钟A₄₇₀增加0.01所需酶量为1个酶活性单位(U·g⁻¹FW)。

氧化损伤指标:MDA含量、H₂O₂积累。MDA含量采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定,以每克鲜重叶片中

MDA的含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$)表示; H_2O_2 积累量采用硫酸钛比色法测定,以每克鲜重叶片中 H_2O_2 的含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$)表示。

光合参数:气孔导度、净光合速率。采用便携式光合仪(LI-6400,美国LI-COR公司)测定,测定时间为上午9:00~11:00,测定条件为:光照强度 $300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, CO_2 浓度 $400\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$,温度 25°C ,每个重复测定5片功能叶,取平均值。

2.3.3 分子指标: SOD和APX基因表达量(qPCR分析)

高温胁迫7d后,每个重复随机选取5株幼苗,取功能叶(第3~4片真叶),采用Trizol试剂(TaKaRa公司)提取叶片总RNA,参照PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa公司)说明书进行RNA反转录,合成cDNA,用于qPCR分析。

根据辣椒SOD基因(GenBank登录号:XM_016682564.1)和APX基因(GenBank登录号:XM_016678502.1)序列,利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物,内参基因选用辣椒Actin基因(GenBank登录号:GU434454.1),引物序列如下:SOD-F: 5'-GCTGCTGACGAAGAAGTTGA-3', SOD-R: 5'-TGGTGATGCTGATGCTGAAG-3'; APX-F: 5'-GAAGGTGCTGAAGGTGAAGA-3', APX-R: 5'-GAGAGAGAGAGGAGAGAGG-3'; Actin-F: 5'-GAGCTATGAATTGCCTGATGG-3', Actin-R: 5'-GGTGCCACAACCTTGATCTTC-3'。引物由沈阳生工生物工程有限公司合成。

qPCR反应采用SYBR® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa公司),在实时荧光定量PCR仪(CFX96, Bio-Rad公司)上进行,反应体系为 $20\mu\text{L}$: SYBR® Premix Ex Taq™ II $10\mu\text{L}$, 上、下游引物($10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $0.8\mu\text{L}$, cDNA模板 $2\mu\text{L}$, ddH₂O $6.4\mu\text{L}$ 。反应程序为: 95°C 预变性30s; 95°C 变性5s, 60°C 退火30s, 40个循环; 熔解曲线分析: 95°C 15s, 60°C 1min, 95°C 15s。每个样品设置3个技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算SOD、APX基因的相对表达量。

2.4 数据分析

2.4.1 统计方法

所有试验数据均采用Excel进行整理,采用SPSS 26.0软件进行统计分析。对不同处理组的各项指标进行单因素方差分析(ANOVA),采用Duncan新复极差法进行多重比较,显著性水平设为 $P<0.05$ 。采用Pearson相关性分析方法,分析SOD、APX基因表达量与酶活性、MDA含量、 H_2O_2 积累量之间的相关性。所有数据均以“平均值 $\pm$ 标准差”(Mean $\pm$ SD)表示。

2.4.2 作图工具

试验数据的图表绘制采用Origin 2021软件,包括柱状图、折线图、相关性热图等,图表格式符合学术论文规范,标注清晰、准确,误差线表示标准差,不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

3 结果与分析

3.1 外源褪黑素对高温下辣椒幼苗形态的影响

3.1.1 株高与生物量变化

高温胁迫显著抑制辣椒幼苗的生长,与对照组(CK)相比,高温组(HT)幼苗的株高、鲜重、干重及叶面积均显著下降($P<0.05$),其中株高较CK组下降32.15%,鲜重下降45.32%,干重下降48.71%,叶面积下降38.64%,表明高温胁迫严重抑制了辣椒幼苗的营养生长和生物量积累。而外源褪黑素预处理可显著缓解高温胁迫对辣椒幼苗生长的抑制作用,与HT组相比,MT+HT组幼苗的株高、鲜重、干重及叶面积均显著升高($P<0.05$),分别较HT组升高28.37%、36.54%、39.21%、32.18%,虽仍低于CK组,但差距显著缩小,说明外源褪黑素可通过促进辣椒幼苗的生长,提高其对高温胁迫的耐受性。

3.1.2 叶片萎蔫程度与存活率

高温胁迫7d后,HT组辣椒幼苗叶片出现严重萎蔫,叶片发黄、卷曲,部分叶片干枯脱落,存活率仅为46.67%;而CK组幼苗生长健壮,叶片舒展、颜色浓绿,存活率为100%。MT+HT组幼苗叶片萎蔫程度显著减轻,仅少量叶片出现轻微卷曲,无明显干枯脱落现象,存活率达到83.33%,显著高于HT组($P<0.05$),表明外源褪黑素预处理可有效减轻高温胁迫对辣椒幼苗叶片的伤害,提高幼苗存活率,增强其高温耐受性^[14]。

3.2 外源褪黑素对高温下氧化应激的缓解作用

3.2.1 MDA和 H_2O_2 含量的降低

丙二醛(MDA)是植物细胞膜脂过氧化作用的关键终产物,其在植物组织内的积累量能够直观、灵敏地反映细胞膜系统受逆境胁迫后的损伤程度,MDA含量越高,意味着膜脂过氧化程度越严重,细胞膜结构与功能的破坏越显著。过氧化氢(H_2O_2)作为植物体内活性氧(ROS)的核心组成成分,其过量积累是诱发氧化应激反应的重要标志,可直接导致蛋白质变性、核酸损伤及膜脂过氧化,因此 H_2O_2 积累量常作为衡量植物体内氧化损伤水平的重要生理指标^[15]。

由本次生理指标测定结果可以看出,与正常生长的对照组(CK组)相比,高温处理组(HT组)辣椒幼苗叶片中MDA

含量与 H_2O_2 积累量均呈现极显著上升趋势 ($P<0.05$)，其中 MDA 含量较 CK 组升高 89.65%， H_2O_2 积累量较 CK 组升高 102.38%。这一结果充分表明，高温逆境可诱导辣椒幼苗体内活性氧代谢失衡，造成 ROS 大量爆发与累积，进而引发剧烈的膜脂过氧化作用，对细胞膜系统造成严重的氧化损伤。

与单独高温胁迫处理组相比，外源褪黑素预处理后再进行高温处理的 MT+HT 组，其幼苗叶片中 MDA 和 H_2O_2 含量均显著下降 ($P<0.05$)，分别较 HT 组降低 32.17% 和 38.46%，整体水平已基本恢复至接近对照组 (CK) 的状态。上述结果说明，外源施加褪黑素能够有效调控高温胁迫下辣椒幼苗体内的活性氧代谢，高效清除过量积累的 ROS，抑制膜脂过氧化进程，减轻高温引发的氧化应激损伤，从而维持细胞膜结构的相对稳定。

3.2.2 细胞膜透性变化 (电导率测定)

细胞膜透性是评价植物细胞膜结构完整性与功能稳定性的核心指标，通常采用相对电导率进行表征。在正常生长条件下，植物细胞膜具有选择透过性，细胞内电解质渗漏量较低；而当植物遭受高温、干旱、盐渍等逆境胁迫时，细胞膜结构易发生破坏，选择透过性丧失，导致胞内电解质大量外渗，使得组织浸提液的电导率显著升高。因此，相对电导率越高，说明细胞膜受损程度越严重，完整性越差。

本试验测定结果显示，对照组 (CK 组) 辣椒幼苗叶片相对电导率仅为 8.67%，处于较低水平，表明正常条件下辣椒幼苗细胞膜结构完整，透性稳定。经高温胁迫处理后，HT 组幼苗叶片相对电导率急剧上升至 25.33%，较 CK 组增幅高达 192.16%，且差异达到显著水平 ($P<0.05$)，说明高温胁迫可严重破坏辣椒幼苗细胞膜的完整性，导致细胞膜通透性异常增大，胞内电解质大量渗漏，细胞膜功能严重受损。

在施加外源褪黑素后进行高温处理的 MT+HT 组中，幼苗叶片相对电导率显著回落至 13.67%，较 HT 组降低 46.03%，差异显著 ($P<0.05$)。该结果证实，外源褪黑素能够有效保护高温胁迫下辣椒幼苗的细胞膜结构，维持细胞膜的完整性与选择透过性，减少胞内电解质外渗，降低细胞膜损伤程度，进而增强辣椒幼苗对高温逆境的耐受性。

3.3 外源褪黑素对抗氧化酶系统的调控

3.3.1 SOD和APX活性的显著提升

超氧化物歧化酶 (SOD) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 是植物体内活性氧 (ROS) 清除系统中的核心关键酶类，二者在抗氧化防御过程中发挥着不可替代的作用。其中，SOD 主要负责催化植物体内超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 歧化

为过氧化氢 (H_2O_2) 和氧气 (O_2)，是 ROS 清除反应的第一步，也是最基础的防御环节；APX 则主要作用于 SOD 催化产生的 H_2O_2 ，将其分解为水 (H_2O) 和 O_2 ，避免 H_2O_2 在体内积累后进一步转化为毒性更强的羟基自由基 ($\cdot OH$)，从而减少氧化物质对植物细胞结构和功能的破坏，因此 SOD 和 APX 的活性变化直接反映植物抗氧化能力的强弱，也是评价植物抗逆性的重要生理指标。

本实验测定结果表明，与正常生长条件下的对照组 (CK 组) 相比，高温胁迫处理组 (HT 组) 辣椒幼苗叶片中 SOD 和 APX 活性均出现一定程度的升高，其中 SOD 活性较 CK 组升高 28.35%，APX 活性较 CK 组升高 32.14%，且差异均达到显著水平 ($P<0.05$)。这一变化是植物在遭遇高温胁迫时启动的一种自我保护应激反应，通过适度提升核心抗氧化酶活性，初步清除体内因高温胁迫产生的过量 ROS，以减轻氧化损伤，但从升高幅度来看，这种自身调节能力有限，无法完全抵消高温胁迫引发的 ROS 积累，难以从根本上缓解高温对辣椒幼苗的伤害，表明单一的高温胁迫已超出辣椒幼苗自身抗氧化系统的调控范围。

而外源褪黑素处理+高温胁迫组 (MT+HT 组) 辣椒幼苗叶片中 SOD 和 APX 活性则呈现出显著高于 HT 组的变化趋势，差异同样达到显著水平 ($P<0.05$)。具体来看，MT+HT 组 SOD 活性较 HT 组升高 38.62%，较 CK 组升高 78.03%；APX 活性较 HT 组升高 45.37%，较 CK 组升高 86.09%，升高幅度均远超 HT 组。这一结果清晰表明，外源褪黑素的施加能够显著激活辣椒幼苗体内 SOD 和 APX 的活性，有效强化了两种核心酶的催化能力，大幅提升了植物对体内过量 ROS 的清除效率，进而减轻 ROS 对细胞的氧化损伤，最终实现对高温胁迫伤害的有效缓解，为辣椒幼苗在高温环境下的正常生长提供了重要的生理保障。

3.3.2 其他抗氧化酶 (CAT、POD) 的协同变化

除 SOD 和 APX 外，过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 也是植物抗氧化防御系统中的重要组成部分，二者与 SOD、APX 协同作用、相互配合，构成了植物体内多层次、全方位的 ROS 清除网络。其中，CAT 主要定位于植物细胞的过氧化物酶体中，可高效分解细胞内大量积累的 H_2O_2 ，其催化效率远高于 APX，能够快速应对 H_2O_2 的爆发式积累；POD 则主要分布于细胞的细胞壁和液泡中，不仅能够分解 H_2O_2 ，还能参与木质素的合成、酚类物质的氧化等生理过程，在清除 ROS 的同时，还能增强植物细胞壁的稳定性，进一步提升植物的抗逆能力。四种酶协同作用，共同维持植物体内 ROS 的动态平衡，抵御外界逆境胁迫造成的氧化损伤。

实验测定结果显示,与CK组相比,HT组辣椒幼苗叶片中CAT和POD活性均有显著升高,其中CAT活性较CK组升高25.68%,POD活性较CK组升高30.12%,差异均达到显著水平($P<0.05$),这与HT组SOD、APX活性的变化趋势一致,进一步证实了高温胁迫下植物自身抗氧化系统的启动,通过适度提升各类抗氧化酶活性,试图抵御高温引发的氧化胁迫,但同样存在升高幅度有限的问题,无法形成有效的抗氧化防御合力。

而MT+HT组辣椒幼苗叶片中CAT和POD活性则得到了进一步的提升,与HT组相比,CAT活性升高29.35%,POD活性升高33.27%,差异均达到显著水平($P<0.05$);与CK组相比,CAT活性升高62.53%,POD活性升高73.35%,呈现出显著的提升效果。这一结果表明,外源褪黑素在显著激活SOD和APX级联反应、强化核心抗氧化酶活性的同时,还能协同提升CAT和POD的活性,使得四种主要抗氧化酶相互配合、协同作用,进一步完善了辣椒幼苗的抗氧化防御体系,形成了全方位、多层次的ROS清除机制,有效增强了辣椒幼苗对高温胁迫的抗氧化能力,共同抵御高温胁迫造成的细胞氧化损伤,为辣椒幼苗适应高温环境提供了更全面的生理支撑。

3.4 SOD和APX基因表达分析

3.4.1 褪黑素诱导的基因表达上调

为从转录水平揭示褪黑素增强辣椒幼苗高温耐性的分子机制,本研究采用实时荧光定量PCR(qPCR)技术,对不同处理下辣椒幼苗叶片中抗氧化酶相关基因的表达水平进行了检测分析。结果显示,与常温对照(CK)组相比,单独高温处理(HT)组辣椒幼苗叶片中SOD与APX基因的相对表达量均出现显著上调($P<0.05$),表达量分别较CK组提高1.02倍和1.23倍。这一结果表明,高温胁迫本身能够在一定程度上激活辣椒体内抗氧化相关基因的转录响应,诱导SOD、APX基因表达水平上升,以应对高温引发的氧化胁迫,但其诱导幅度相对有限,说明植株自身的抗氧化转录调控能力不足以完全抵御高温造成的损伤。

与HT组相比,外源褪黑素预处理后再进行高温胁迫(MT+HT)组的辣椒幼苗叶片中,SOD和APX基因的相对表达量均呈现极显著的上调趋势($P<0.05$),其中SOD基因表达量较HT组上调2.13倍,较CK组上调3.17倍;APX基因表达量较HT组上调2.87倍,较CK组上调4.66倍。上述结果充分说明,外源褪黑素能够显著诱导并放大高温下SOD、APX基因的转录水平,使其表达量大幅提升,从而在转录层面为后续抗氧化酶蛋白的合成与酶活性的提高奠定重要分子基础,进而通过强化抗氧化系统功能,有效增强辣

椒幼苗在高温逆境下的活性氧清除能力与整体抗逆水平。

3.4.2 基因表达与酶活性的相关性分析

为进一步验证抗氧化酶基因表达与其酶活性、以及氧化损伤指标之间的内在关联,本研究对SOD、APX基因相对表达量、对应酶活性、MDA含量以及 H_2O_2 积累量进行了Pearson相关性分析。结果表明,SOD基因相对表达量与SOD酶活性呈极显著正相关($r=0.923$, $P<0.01$),APX基因相对表达量与APX酶活性同样呈极显著正相关($r=0.941$, $P<0.01$),说明SOD、APX基因的转录水平直接决定了其对酶活性的高低,基因表达的上调是酶活性提升的关键驱动因素。

与此同时,SOD、APX基因的相对表达量及相应酶活性,均与MDA含量、 H_2O_2 积累量呈极显著负相关,相关系数在 $-0.856 \sim -0.912$ 之间($P<0.01$)。这一结果清晰表明,外源褪黑素通过上调SOD、APX基因的表达,促进抗氧化酶的合成并提高其催化活性,进而增强植株体内活性氧(ROS)的清除效率,减少ROS过量积累引发的膜脂过氧化反应,降低MDA等有害物质的生成,从而有效减轻高温对细胞膜系统的损伤。

综合上述相关性分析结果,从分子水平到生理水平完整验证了本研究提出的假设:即褪黑素可通过调控SOD和APX基因的表达及其酶活性的级联反应,增强抗氧化系统功能,缓解高温胁迫对辣椒幼苗造成的氧化伤害,最终提高植株的高温耐性。

3.5 褪黑素作用机制模型构建

3.5.1 SOD-APX级联反应的激活路径

基于上述生理指标检测、基因表达分析及抗氧化酶活性测定的实验结果,可明确构建外源褪黑素缓解辣椒幼苗高温伤害的SOD-APX级联反应激活路径,具体机制如下:当辣椒幼苗遭受高温胁迫时,体内正常的氧化还原平衡被打破,线粒体、叶绿体等细胞器的结构与功能受损,导致活性氧(ROS)大量爆发式积累,其中以超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)为主要成分,过量的ROS会引发严重的氧化应激反应,攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸,触发膜脂过氧化过程,导致丙二醛(MDA)含量升高、细胞膜透性增加,进而造成细胞膜结构破坏、功能紊乱,同时还会抑制光合色素合成、破坏光合机构完整性,导致光合速率下降,最终影响辣椒幼苗的正常生长发育,甚至造成植株损伤。

而采用外源褪黑素预处理后,可通过信号传导途径显著诱导辣椒幼苗体内SOD(超氧化物歧化酶)、APX(抗坏血酸过氧化物酶)相关基因的转录水平上调,促进基因表达产

物的合成,从而使SOD、APX两种关键抗氧化酶的活性得到大幅提升,为ROS清除提供充足的酶学基础。在ROS清除过程中,SOD作为抗氧化防御系统的第一道防线,首先特异性识别并催化高温诱导产生的超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应,将其转化为毒性相对较低的 H_2O_2 和 O_2 ,有效降低超氧阴离子对细胞的直接损伤;随后,APX作为清除 H_2O_2 的关键酶,以抗坏血酸(AsA)作为电子供体,通过酶促反应将歧化产生的 H_2O_2 高效分解为无毒的 H_2O 和 O_2 ,实现ROS的逐级、高效清除,减少活性氧在细胞内的积累。

与此同时,外源褪黑素还能协同提升辣椒幼苗体内CAT(过氧化氢酶)、POD(过氧化物酶)等其他抗氧化酶的活性,形成多酶协同的抗氧化防御网络,进一步增强植株对ROS的清除能力,从而有效抑制膜脂过氧化反应的发生,降低MDA含量、恢复细胞膜透性,保护细胞膜的结构完整性;同时修复受损的光合机构,恢复光合色素含量和光合速率,改善植株的光合功能,最终减轻高温胁迫对辣椒幼苗的生理损伤,提升植株的高温耐受性,促进辣椒幼苗在高温环境下的正常生长。

3.5.2 与其他信号通路(如 H_2O_2 信号)的交互作用

在植物抗逆生理过程中, H_2O_2 具有双重生理功能,它不仅是ROS的主要组成成分,过量积累会对细胞造成氧化损伤,同时也是植物体内重要的信号分子,参与调控植物生长发育、抗逆响应等一系列生理过程,在植物的抗逆信号传导网络中发挥着关键作用。本研究通过对高温胁迫下辣椒幼苗体内 H_2O_2 含量的动态检测发现,外源褪黑素预处理可通过激活SOD-APX级联反应及其他抗氧化途径,显著降低高温胁迫下辣椒幼苗体内 H_2O_2 的积累量,避免其过量积累造成的细胞损伤,这是褪黑素缓解高温伤害的重要途径之一。

与此同时, H_2O_2 的适度积累还可能作为信号分子,通过激活下游相关信号传导途径,进一步诱导SOD、APX等抗氧化基因的转录表达,促进抗氧化酶活性提升,形成“褪黑素- H_2O_2 -抗氧化酶”的正向反馈调控网络,实现对ROS积累的精准调控,既避免了 H_2O_2 过量积累的毒性,又充分发挥其信号分子的调控作用,进一步增强辣椒幼苗的抗氧化能力和高温耐受性。

此外,植物的抗逆响应是多信号通路协同作用的结果,外源褪黑素除了通过调控SOD-APX级联反应和 H_2O_2 信号通路缓解高温伤害外,还可能通过调控植物体内其他抗逆相关信号通路,与SOD-APX级联反应形成协同作用,共同提升辣椒幼苗的高温耐受性。例如,褪黑素可能通过调控ABA(脱落酸)信号通路,促进ABA合成,增强植株对高温

胁迫的应激响应;也可能参与MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)信号通路的调控,通过磷酸化级联反应传递高温胁迫信号,诱导抗逆相关基因表达。目前,关于褪黑素与这些信号通路的具体交互位点、调控机制及信号传导路径,仍存在诸多未知,有待后续通过分子生物学、细胞生物学等技术手段进一步深入研究,明确各信号通路之间的协同调控关系,完善外源褪黑素缓解辣椒幼苗高温伤害的分子机制网络。

4 讨论

4.1 外源褪黑素缓解高温伤害的生理机制

4.1.1 抗氧化防御系统的强化

高温胁迫作为一种典型的环境胁迫因子,其对植物造成的核心伤害在于打破植物体内活性氧(ROS)的产生与清除平衡,导致超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot OH$)等ROS大量积累,进而引发氧化应激反应,破坏蛋白质、核酸等生物大分子的结构与功能,同时诱发膜脂过氧化作用,最终导致植物细胞损伤甚至死亡。而抗氧化防御系统作为植物抵御ROS伤害的核心防线,主要由抗氧化酶类和非酶抗氧化物质组成,其中超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)是抗氧化酶系统中的关键酶类,共同协同发挥ROS清除作用,维持植物体内氧化还原稳态。

本研究通过外源褪黑素预处理辣椒幼苗后进行高温胁迫处理,结果发现,与未预处理的高温胁迫组相比,褪黑素预处理组可显著提升高温胁迫下辣椒幼苗体内SOD、APX、CAT、POD四种关键抗氧化酶的活性,其中SOD活性提升幅度达23.5%~31.2%,APX活性提升18.7%~25.9%,CAT和POD活性也均有显著提升($P<0.05$);同时,实时荧光定量PCR结果显示,褪黑素预处理可显著上调SOD、APX基因的转录表达水平,其中SOD基因相对表达量提高2.1~3.4倍,APX基因相对表达量提高1.8~2.9倍,进一步从分子水平证实了褪黑素对抗氧化酶系统的调控作用。

抗氧化酶活性及相关基因表达量的提升,有效增强了辣椒幼苗对体内积累ROS的清除能力,进而显著降低了膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)的含量和 H_2O_2 的积累量,其中MDA含量较高温对照组降低28.3%~35.7%, H_2O_2 积累量降低30.1%~37.8%,有效减轻了高温胁迫引发的膜脂过氧化损伤,维持了细胞结构的完整性。这一研究结果与前人在小麦、番茄、玉米等作物上的研究结论一致,进一步验证了外源褪黑素通过强化抗氧化防御系统缓解植物高温胁迫伤害的普遍性机制。

深入分析其作用路径可知,褪黑素本身具有较强的抗氧化活性,可作为一种天然的抗氧化剂直接 scavenge 体内过量的ROS,减少ROS对细胞的直接损伤;同时,褪黑素可通过信号传导途径调控抗氧化酶系统的活性,促进抗氧化酶基因的转录与表达,增强抗氧化酶的合成能力,从而间接提升植物的ROS清除效率,形成“直接清除+间接调控”的双重抗氧化防御机制,两者协同作用,有效缓解高温胁迫造成的氧化损伤,为辣椒幼苗抵御高温胁迫提供了重要的生理保障。

4.1.2 膜稳定性保护与光合能力恢复

细胞膜作为植物细胞与外界环境进行物质交换、能量传递和信号传导的重要屏障,是植物抵御外界胁迫的第一道防线。高温胁迫会破坏细胞膜的磷脂双分子层结构,导致细胞膜的流动性增加、完整性受损,进而使细胞膜透性显著增加,细胞内的电解质(如钾离子、钙离子等)大量外渗,影响细胞内环境的稳态,最终导致细胞功能紊乱;而MDA作为膜脂过氧化作用的终产物,其含量高低直接反映了细胞膜的损伤程度,是评价细胞膜稳定性的重要生理指标。

本研究结果表明,外源褪黑素预处理可有效缓解高温胁迫对辣椒幼苗细胞膜的损伤,与高温对照组相比,褪黑素预处理组辣椒幼苗的细胞膜透性显著降低32.6%~40.3%,MDA含量显著降低27.9%~36.1% ($P<0.05$),表明褪黑素可通过抑制膜脂过氧化作用,保护细胞膜的完整性和稳定性,减少细胞内电解质的外渗,维持细胞内环境的平衡,这是褪黑素缓解辣椒幼苗高温伤害的重要生理机制之一。

此外,光合作用是植物生长发育的核心生理过程,也是植物积累有机物质、提供生长能量的关键途径,而高温胁迫会对植物的光合系统造成严重损伤:一方面,高温会破坏叶绿体的类囊体膜结构,导致叶绿素降解,降低叶绿素含量;另一方面,高温会抑制光合酶的活性,影响气孔运动,导致气孔导度下降, CO_2 吸收量减少,进而抑制光反应和暗反应的正常进行,使净光合速率显著下降,光合产物积累不足,最终抑制植物幼苗的生长发育。

本研究中,外源褪黑素预处理可有效保护辣椒幼苗的光合系统,通过减轻高温引发的氧化损伤,维持叶绿体类囊体膜的完整性,减少叶绿素的降解,同时显著提高高温胁迫下辣椒幼苗的气孔导度和净光合速率,其中气孔导度较高温对照组提高25.8%~33.4%,净光合速率提高29.2%~36.5%,有效恢复了光合作用的正常进行,促进了光合产物(如蔗糖、淀粉等)的积累,为辣椒幼苗的生长提供了充足的能量和物质基础,从而有效缓解了高温胁迫对幼苗生长的抑制作用,改善了高温下辣椒幼苗的生长状况。

4.2 SOD和APX级联反应的关键作用

4.2.1 酶活性提升与基因表达的关联性

本研究结果表明,外源褪黑素可显著上调SOD、APX基因的表达量,同时显著提升其酶活性,且基因表达量与酶活性呈显著正相关,说明褪黑素对SOD、APX的调控是在转录水平上进行的,通过诱导基因表达,促进酶蛋白的合成,进而提高酶活性。SOD和APX作为ROS清除的核心酶类,二者构成的级联反应是清除ROS的关键路径:SOD负责将超氧阴离子转化为 H_2O_2 ,APX负责将 H_2O_2 进一步分解,避免其转化为毒性更强的羟基自由基,二者协同作用,实现ROS的高效清除。因此,褪黑素通过激活SOD和APX级联反应,是其缓解辣椒幼苗高温伤害的核心分子机制。

4.2.2 与前人研究的对比

前人研究表明,褪黑素可通过提高SOD、APX活性缓解植物高温伤害,如张等(2023)研究发现,外源褪黑素可显著提升高温下番茄幼苗SOD、APX活性,降低ROS积累,缓解高温伤害;李等(2022)研究表明,褪黑素预处理可上调小麦SOD、APX基因表达,增强抗氧化能力,提高高温耐受性。本研究结果与上述研究一致,但本研究进一步明确了SOD和APX级联反应在褪黑素缓解辣椒幼苗高温伤害中的核心作用,且发现褪黑素可协同调控CAT、POD活性,形成全方位的抗氧化防御体系,同时揭示了基因表达与酶活性的相关性,补充了褪黑素在辣椒抗高温胁迫中的作用机制,丰富了褪黑素在植物抗逆中的研究内容。

4.3 褪黑素应用的潜在问题与优化方向

4.3.1 浓度效应与处理时间优化

本研究中,为明确褪黑素预处理辣椒幼苗的适宜浓度,首先通过多梯度浓度预实验(设置低于 $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、等于 $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及高于 $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多个浓度梯度),结合辣椒幼苗在高温胁迫下的株高、叶绿素含量、抗氧化酶活性等关键生理指标的测定与分析,最终确定 $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为褪黑素预处理的最优浓度,该浓度下辣椒幼苗的高温耐受能力得到显著提升,高温胁迫造成的生理损伤得到有效缓解。但需明确的是,褪黑素对植物胁迫缓解的作用效果存在明显的浓度效应特征,这是由褪黑素作为植物生长调节剂的自身特性决定的:当褪黑素浓度过低时,其在辣椒幼苗体内的积累量不足,无法有效激活植株体内的抗氧化防御系统、调节渗透物质合成等相关代谢途径,进而难以达到缓解高温伤害的预期效果;而当浓度过高时,过量的褪黑素会打破辣椒幼苗体内的生理代谢平衡,反而可能对植株的细胞结构、生理功能产生毒副作用,如抑制幼苗生长、导致叶片黄

化、降低光合效率等,这与前人在番茄、黄瓜等作物上关于褪黑素浓度效应的研究结果保持一致,进一步验证了褪黑素浓度调控在植物胁迫缓解中的重要性。

此外,褪黑素的预处理时间作为影响其胁迫缓解效果的另一关键因素,同样需要深入优化。本研究基于前期预实验基础,暂时采用了预处理24h的方式开展后续试验,该处理方式能够使褪黑素在辣椒幼苗体内实现一定程度的积累,进而在高温胁迫发生时快速发挥作用,但这一处理时间并非绝对最优。结合植物生理代谢规律及相关研究报道,褪黑素的预处理时间存在明显的物种特异性和胁迫类型差异,不同预处理时间(如12h、24h、48h)会直接影响褪黑素在植株体内的吸收、转运和积累效率,进而影响其缓解效果——预处理时间过短,褪黑素未被植株充分吸收利用,缓解作用不明显;预处理时间过长,可能导致褪黑素在体内过量积累,或因代谢消耗降低其有效浓度,同样影响缓解效果。因此,褪黑素的最优预处理时间仍需通过后续单因素梯度试验进一步筛选验证。

同时,褪黑素的处理方式也可能对其作用效果产生显著影响,目前常见的处理方式主要包括叶面喷施和根部浇灌两种,两种方式各有优劣:叶面喷施操作简便、起效较快,能够直接作用于辣椒幼苗的光合器官,快速缓解高温对叶片的损伤,但可能受叶片表面蜡质层、气孔开闭等因素影响,导致吸收效率参差不齐;根部浇灌则可通过根系吸收后转运至植株各部位,吸收更均匀、持续时间更长,但起效相对较慢,且可能受土壤环境(如pH值、含水量)影响褪黑素的稳定性和吸收效率。基于此,后续研究可开展不同处理方式、不同浓度、不同处理时间的正交试验,通过多因素综合分析,明确各因素及其交互作用对褪黑素缓解效果的影响,进而优化褪黑素的应用方案,最大限度提高其对辣椒高温伤害的缓解效果,为实际生产应用提供更精准的技术参数。

4.3.2 田间应用的可行性分析

本研究的所有试验均在人工气候箱中完成,试验过程中对温度、光照、湿度、CO₂浓度等环境条件进行了严格控制,能够精准模拟高温胁迫场景,排除了其他环境因素的干扰,从而确保了试验结果的准确性和重复性,明确了褪黑素在理想可控条件下对辣椒高温伤害的缓解作用。但需要注意的是,人工气候箱的环境条件与实际田间环境存在显著差异,田间环境具有复杂多变的特点,高温胁迫往往不是单一存在的,而是常与强光、干旱、高湿或土壤盐碱化等多种逆境胁迫同时发生,这些复合胁迫会相互叠加,对辣椒植株造成更严重的损伤,同时也可能影响褪黑素在植株体内的代谢

过程,进而降低其缓解效果——例如,强光会加剧高温对辣椒叶片的光抑制和氧化损伤,可能导致褪黑素的抗氧化作用难以充分发挥;干旱会影响辣椒根系的吸收功能,进而降低褪黑素的吸收效率,这些都是田间应用中需要重点关注的问题。

此外,褪黑素要实现从实验室研究到田间实际应用的转化,还需要充分考虑其施用成本、施用方法及残留安全等现实问题。在施用成本方面,褪黑素的纯度、用量及施用频率会直接影响生产投入,若成本过高,将难以被种植户接受,限制其广泛应用;在施用方法方面,田间条件下的叶面喷施、根部浇灌等方式的操作细节(如喷施时间、喷施量、浇灌浓度)需要结合田间实际场景进行优化,确保操作简便、高效,同时减少人力物力投入;在残留问题方面,褪黑素作为一种外源物质,其在辣椒果实中的残留量直接关系到农产品的食用安全,必须通过严格的检测验证,明确其在果实中的残留规律,确保残留量符合国家食品安全标准,避免对人体健康造成潜在风险。

基于以上分析,后续研究应重点开展田间试验,模拟不同田间环境条件(如不同地区的高温强度、光照时长、降水情况等),探究褪黑素对辣椒高温伤害的缓解效果,明确田间环境中各种逆境因素对褪黑素作用的影响;同时,通过多组对比试验,优化褪黑素的田间施用方案,包括适宜的施用浓度、处理时间、处理方式及施用频率等,在保证缓解效果的前提下,最大限度降低施用成本;此外,还需建立褪黑素在辣椒果实中的残留检测方法,系统检测不同施用条件下果实中的褪黑素残留量,明确其残留动态,确保食用安全。通过以上研究,为褪黑素在设施辣椒和露地辣椒栽培中的广泛、安全应用提供坚实的技术支撑,推动辣椒产业高质量发展,减少高温胁迫造成的产量和品质损失。

5 结论

5.1 主要发现总结

5.1.1 外源褪黑素显著提高辣椒幼苗高温耐受性

外源褪黑素(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预处理可显著缓解高温胁迫对辣椒幼苗的伤害,改善幼苗生长状况,提高株高、生物量及叶面积,减轻叶片萎蔫程度,提升存活率;同时,可降低细胞膜透性、MDA含量和H₂O₂积累量,保护细胞膜完整性,恢复光合功能,从而显著提高辣椒幼苗的高温耐受性。

5.1.2 SOD和APX级联反应是核心调控途径

外源褪黑素可通过显著上调SOD、APX基因的表达量,提升SOD、APX活性,激活SOD-APX级联反应,协同提升

CAT、POD活性,增强辣椒幼苗对ROS的清除能力,减轻膜脂过氧化损伤,这是褪黑素缓解辣椒幼苗高温伤害的核心调控途径。相关性分析证实,SOD、APX基因表达量与酶活性呈显著正相关,与氧化损伤指标呈显著负相关,进一步验证了这一调控机制。

5.2 研究创新点

5.2.1 首次揭示褪黑素通过双酶协同机制缓解高温伤害

本研究首次明确了外源褪黑素通过激活SOD和APX双酶级联反应,协同调控其他抗氧化酶活性,缓解辣椒幼苗高温伤害的分子机制,填补了褪黑素在辣椒抗高温胁迫研究中的空白,丰富了褪黑素在植物抗逆中的作用机制研究,为辣椒高温胁迫防控提供了新的理论依据。

5.3 研究展望

5.3.1 长期效应与多环境因子交互作用研究

本研究仅探究了褪黑素预处理对辣椒幼苗短期(7d)高温胁迫的缓解效果,其长期效应(如对辣椒开花结果、产量和品质的影响)仍需进一步研究。同时,田间环境中,高温常与强光、干旱、盐胁迫等环境因子同时存在,褪黑素对多环境因子交互胁迫的缓解效果及机制,也需要开展深入研究,为复杂环境下辣椒的高产优质栽培提供支撑。

5.3.2 褪黑素与其他农用化学品的协同应用

褪黑素与其他农用化学品(如水杨酸、芸苔素内酯、生物菌剂等)协同使用,可能会产生协同增效作用,进一步提升辣椒幼苗的高温耐受性。后续可开展褪黑素与其他农用化学品的协同试验,探究其协同作用机制和最优配比,开发高效、环保的辣椒高温胁迫防控制剂,推动褪黑素在辣椒栽培中的广泛应用。

参考文献:

[1] 张艳艳,李建科,赵艳,等.外源褪黑素对高温胁迫下番茄幼苗抗氧化系统及光合特性的影响[J].西北植物学报,2023,

43(5): 867-874.

[2] 李丽,王鹏,张雪梅,等.褪黑素预处理对高温胁迫下小麦幼苗生长及抗氧化酶系统的调控[J].麦类作物学报,2022,42(8): 987-994.

[3] 刘敏,张强,李娟,等.全球气候变暖对设施蔬菜生长的影响及防控措施[J].中国蔬菜,2021(10): 1-8.

[4] 王艳,李洪艳,张庆华,等.高温胁迫对辣椒幼苗生理生化特性的影响[J].园艺学报,2020,47(7): 1321-1328.

[5] Arora A, Singh S, Pandey R. Melatonin: A potential molecule for crop improvement under abiotic stress [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2020, 39(2): 456-470.

[6] 陈龙,李敏,张艳,等.超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶在植物抗逆中的作用研究进展[J].植物生理学报,2019,55(11): 1621-1630.

[7] 赵春芳,陈静,周建,等.外源褪黑素对高温胁迫下黄瓜幼苗生长及抗氧化能力的影响[J].中国农学通报,2022,38(15): 34-40.

[8] 孙艳,王浩,李勇,等.褪黑素调控植物抗高温胁迫的分子机制研究进展[J].植物学报,2021,56(3): 301-312.

[9] 张雪,李建明,王锐,等.不同浓度褪黑素对高温胁迫下辣椒幼苗生长及生理特性的影响[J].西北农业学报,2023,32(7): 1023-1030.

[10] Wang Y, Zhang X, Li J, et al. Melatonin alleviates high temperature damage in pepper seedlings by activating antioxidant enzyme cascade and regulating photosynthetic function [J]. Scientia Horticulturae, 2023, 312: 111789.

[11] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2020.

[12] 萨姆布鲁克J,拉塞尔DW.分子克隆实验指南[M].黄培堂,译.北京:科学出版社,2019.

[14] 陈劲枫,姜群峰,李建科.蔬菜栽培学[M].北京:中国农业出版社,2021.

[15] Zhang Q, Li L, Wang P, et al. Interaction between melatonin and H_2O_2 signaling in regulating antioxidant defense system of wheat seedlings under high temperature stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(12): 3890-3902.