北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

复合种植模式下谷胱甘肽和*GST2*调控活性氧清除增强林下植物抗寒性

范雨欣 于艺濛 董碧莹 吴睿 SuprunIvan Ivanovich 杨清 孟冬

Glutathione and *GST2* regulating reactive oxygen species scavenging to enhance cold resistance of understory plants under intercropping patterns

Fan Yuxin, Yu Yimeng, Dong Biying, Wu Rui, Suprun Ivan Ivanovich, Yang Qing, Meng Dong

引用本文:
范雨欣, 于艺濛, 董碧莹, 吴睿, SuprunIvan Ivanovich, 杨清, 孟冬. 复合种植模式下谷胱甘肽和*GST2*调控活性氧清除增强林下植物抗寒性[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(1):73–87. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250186
Fan Yuxin, Yu Yimeng, Dong Biying, Wu Rui, Suprun Ivan Ivanovich, Yang Qing, Meng Dong. Glutathione and *GST2* regulating reactive oxygen species scavenging to enhance cold resistance of understory plants under intercropping patterns[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(1):73–87. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250186

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250186

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

枣*CML*基因的分子特征及其抗寒性表达模式分析
Molecular characteristics of *CML* genes in Chinese jujube and their expression patterns in resistance to cold stress
北京林业大学学报, 2023, 45(3): 58–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210334

日本落叶松谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）酶学特性与抗逆性研究
Studies on enzymatic properties and stress resistance of glutathione peroxidase (GPX) from *Larix kaempferi*
北京林业大学学报, 2023, 45(2): 78–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210230

山新杨谷胱甘肽S–转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析
Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S–transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 68–78. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240020

过表达胡杨*PEPKR2*负调控拟南芥的镉耐受性
Overexpression of *Populus euphratica PEPKR2* negatively regulates cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2025, 47(4): 21–36. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240376

过表达胡杨*PeAnn1*负调控拟南芥的抗旱性
Overexpression of *PeAnn1* from *Populus euphratica* negatively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2020, 42(6): 14–25. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200031

过表达胡杨*PePKS5*提高拟南芥耐盐性
Overexpression of *Populus euphratica PePKS5* enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2024, 46(2): 62–74. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220480

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250186

复合种植模式下谷胱甘肽和 *GST2* 调控活性氧清除增强林下植物抗寒性

范雨欣[1]　于艺濛[2]　董碧莹[3]　吴　睿[2]　Suprun Ivan Ivanovich[4]
杨　清[1,2]　孟　冬[1,2]

（1. 林木资源高效生产国家重点实验室，北京 100083；2. 北京林业大学林学院，北京 100083；3. 北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083；4. 北高加索联邦园艺与葡萄酿酒科学中心，俄罗斯联邦 克拉斯诺达尔 350901）

摘要:【目的】本研究聚焦蓝靛果、木豆和黄芩的复合种植模式，探究其对林下植物抗低温胁迫能力的影响，并解析谷胱甘肽（GSH）及其代谢通路相关基因 *GST*2 在抗氧化防御中的作用。**【方法】**采用复合种植与单独种植对比试验，测定正常温度（25 ℃）和低温胁迫（0 ℃）下植物体内 H_2O_2、谷胱甘肽（GSH）含量及抗氧化酶（CAT、APX、GST、SOD、POD）活性变化。通过外源喷施 GSH 以及构建过表达谷胱甘肽转移酶 2 基因（*GST*2）载体，真空渗透瞬时转化到木豆植株中，进一步验证 GSH 和 *GST*2 在抗氧化防御中的作用机制。**【结果】**复合种植显著提高林下植物的 GSH 含量及其抗氧化酶活性。低温处理后，复合种植的蓝靛果、木豆、黄芩中，H_2O_2 含量分别降低了 16.04%、38.98%、10.10%，GSH 含量分别提高了 7.63%、13.4%、8.85%，GST 活性分别提高了 1.81、5.37、3.13 倍。外源喷施 GSH 可增强木豆抗寒性，使 H_2O_2 含量下降了 19.89%，CAT、APX、GST 酶活性分别提高了 14.81%、24.18%、14.24%，GSH 含量提高了 37.48%。过表达 *GST*2 的木豆在低温胁迫下，H_2O_2 和 MDA 含量分别下降了 10.10%、14.73%，GSH 含量提高了 10.68%，APX、SOD、POD 酶活性显著增强。**【结论】**复合种植通过提升 GSH 含量，激活抗坏血酸-谷胱甘肽（ASA-GSH）通路以协同清除活性氧（ROS）；在此基础上，*GST*2 基因的过表达进一步强化了该通路的运行效率，这 2 种机制的协同作用共同增强了林下植物的抗寒性。本研究为复合种植模式在抗寒栽培中的应用提供了理论依据。

关键词：复合种植；谷胱甘肽；活性氧；抗寒性；林下植物；基因表达
中图分类号：S718　**文献标志码：**A　**文章编号：**1000−1522(2026)01−0073−15
引文格式：范雨欣，于艺濛，董碧莹，等. 复合种植模式下谷胱甘肽和 *GST*2 调控活性氧清除增强林下植物抗寒性［J］. 北京林业大学学报，2026，48(1)：73−87. Fan Yuxin, Yu Yimeng, Dong Biying, et al. Glutathione and *GST*2 regulating reactive oxygen species scavenging to enhance cold resistance of understory plants under intercropping patterns［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(1): 73−87.

Glutathione and *GST*2 regulating reactive oxygen species scavenging to enhance cold resistance of understory plants under intercropping patterns

Fan Yuxin[1]　Yu Yimeng[2]　Dong Biying[3]　Wu Rui[2]　Suprun Ivan Ivanovich[4]
Yang Qing[1,2]　Meng Dong[1,2]

(1. State Key Laboratory of Forest Resources High Efficiency Production, Beijing 100083, China;
2. School of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
3. School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
4. North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine Making, Krasnodar 350901, Russian Federation)

收稿日期: 2025−05−25　**修回日期:** 2025−07−04
基金项目:“十四五”国家重点研发计划（2023YFD2201801），国家自然科学基金项目（32371835、32171742、32401533），国家资助博士后研究人员计划 B 档（GZB20230059），国家自然科学基金青年项目（32401533）。

第一作者: 范雨欣。主要研究方向：林木分子抗逆。Email：1347710566@qq.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者: 孟冬，博士，教授。主要研究方向：林木分子抗逆。Email：mengdongjlf@163.com　地址：同上。

本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn；https://journal.bjfu.edu.cn

Abstract: [**Objective**] This study focused on the effects of composite planting patterns of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea*), pigeonpea (*Cajanus cajan*), and scutellaria (*Scutellaria baicalensis*) on the resistance of understory plants to low-temperature stress. The study also analyzed the roles of glutathione (GSH) and its metabolic pathway-related genes in antioxidant defense. We analyzed the role of glutathione and its metabolic pathway-related genes in antioxidant defense. [**Method**] We used intercropping and individual planting to determine changes in H_2O_2 and GSH contents, as well as the activity of antioxidant enzymes (CAT, APX, GST and POD) under normal (25 ℃) and low temperature (0 ℃) stress. We further verified the mechanism of GSH and *GST*2 in antioxidant defense by spraying GSH exogenously, as well as by constructing a vector for overexpression of glutathione transferase 2 (*GST*2) gene and transiently transforming it into pigeonpea plants via vacuum infiltration. [**Result**] Intercropping significantly increased GSH content and antioxidant enzyme activities in understory plants. After low-temperature stress, H_2O_2 content decreased by 16.04%, 38.98% and 10.10%; GSH content increased by 7.63%, 13.4% and 8.85%; and GST activity increased by 1.81, 5.37 and 3.13 fold, respectively in the intercropping of blue honeysuckle, pigeonpea and scutellaria. Exogenous GSH spraying enhanced pigeonpea's cold resistance by decreasing H_2O_2 content by 19.89%, and increasing CAT, APX, and GST enzyme activities by 14.81%, 24.18% and 14.24%, respectively, as well as increasing GSH content by 37.48%. The H_2O_2 and MDA contents of pigeonpea overexpressing *GST*2 decreased by 10.10% and 14.73%, respectively. The GSH content increased by 10.68%. The activities of APX, SOD and POD enzymes were significantly enhanced under low-temperature stress. [**Conclusion**] Intercropping activates the glutathione-ascorbate (GSH-ASA) pathway by increasing GSH content, which synergistically scavenges reactive oxygen species (ROS). Overexpression of *GST*2 gene enhances the antioxidant efficacy of this pathway. Together, they enhance the cold resistance of understory plants. This study establishes the theoretical basis for applying intercropping pattern to cold-resistant cultivation.

Key words: intercropping; glutathione; reactive oxygen species (ROS); cold resistance; understory plants; gene expression

复合种植模式能提升林下植物的附加价值和使用价值、调整林农产业结构、优化资源配置、提高经济发展效率[1−5]。近年来，复合种植在模式创新上取得显著进展，衍生出玉米(*Zea mays*)−大豆(*Glycine max*)、林木−药材、林农草等多元化立体配置体系，兼顾经济效益与生态功能[6−11]。蓝靛果(*Lonicera caerulea*)、黄芩(*Scutellaria baicalensis*)、木豆(*Cajanus cajan*)等林下植物在森林生态系统中占据着重要地位，但其产业发展面临低温胁迫的严峻挑战。黄芩作为传统中药材，市场需求旺盛，但北方种植区因冬季冻害导致产量不稳，制约中药产业链供给[7]。蓝靛果富含花青素，在功能性食品市场潜力巨大，但主产区寒潮频发影响果实品质与采收期[12−13]。木豆兼具固氮修复与饲料价值，但低温敏感性阻碍其向高纬度推广，限制其在退化地生态修复中的应用[14]。目前，林下植物抗寒性研究是突破产业瓶颈的关键，通过分子育种提升耐低温能力，可扩大适种区域、降低越冬成本、保障原料稳定供应。结合复合种植优化(如蓝靛果−黄芩−木豆混种)，还能协同增强系统抗逆性，提高土地利用效率。

低温胁迫是制约林下植物生长、发育及地理分布的关键非生物逆境因子[15−16]。有研究[17]表明，低温诱导林下植物体内活性氧(ROS)(如O_2^-、H_2O_2)过量积累，导致膜系统氧化损伤。为应对此胁迫，植物进化出复杂机制，其中代谢产物(如可溶性糖、脯氨酸及抗氧化物质)的积累对维持细胞渗透平衡和清除 ROS、增强抗寒性至关重要[18]。同时，植物激素 ABA 在介导低温应激反应中发挥核心作用[19]。而非 ABA 依赖性的 ICE-CBF/DREB-COR 信号通路更是植物冷适应的核心调控枢纽[20]。关键激酶如 OST1 通过磷酸化稳定并激活 *ICE*1，进而诱导 *CBF*/*COR* 表达，正向调控耐寒性[21]。冷激活 *OST*1/*SnRK*2.6 磷酸化 *ICE*1，抑制 *ICE*1 被 *HOS*1 降解，从而正向调节耐冻性[21−22]。而 *MPK*3/6 等则可能通过磷酸化降解 *ICE*1 起负向调控作用[23−24]。在水稻(*Oryza sativa*)中，*OsMPK*3 磷酸化并稳定 *OsICE*1，*OsICE*1 调节海藻糖合成酶 OsTPP1 的表达，从而正向调节低温耐受性[25]。然而，在复合种植模式下，林下植物如何通过代谢物交互作用精细调控其耐低温性，相关研究尚属空白。因此，深入探究林下植物低温胁迫响应的

代谢物与分子机制，不仅对解析其环境适应性具有重要理论意义，也为优化寒地林下复合种植模式、提升农林生态系统生产力提供关键的科学依据和实践指导。

ROS 在植物应对低温胁迫过程中发挥着关键作用。当植物长时间受到低温胁迫时，细胞内的代谢平衡被打破，ROS 如超氧阴离子、过氧化氢等大量积累[26]。适量的 ROS 可以作为信号分子，激活植物的防御反应，但过量的 ROS 会攻击细胞内的生物大分子，如蛋白质、脂质和核酸，导致膜脂过氧化、蛋白质变性和 DNA 损伤，严重影响细胞的正常功能，甚至导致细胞死亡[27]。因此，维持细胞内 ROS 的动态平衡是植物抵御低温胁迫的关键环节[26−28]。抗氧化系统是植物维持 ROS 平衡的重要保障，该系统由一系列抗氧化酶和抗氧化物质组成，其中，抗氧化酶包括超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、过氧化物酶（POD）和抗坏血酸过氧化物酶（APX）等，抗氧化物质则包括抗坏血酸（ASA）、谷胱甘肽（GSH）、类胡萝卜素和多酚类物质等，它们可以直接清除 ROS。谷胱甘肽（GSH）作为植物体内一种重要的非蛋白质巯基化合物，在抗氧化防御中发挥着核心作用[29]。GSH 具有独特的化学结构，使其能够直接与 ROS 反应，将其还原为无害的物质。同时，GSH 还是多种抗氧化酶的底物和辅因子，能够参与 ASA - GSH 循环等重要的抗氧化途径，调节抗氧化酶的活性，增强植物的抗氧化能力。此外，GSH 还可以作为信号分子，参与植物的生长发育、逆境响应和细胞程序性死亡等过程的调控[30−31]。

复合种植系统中，林下植物间的互作可显著影响其抗逆性。谷胱甘肽作为核心抗氧化物质，在清除 ROS 和维持氧化还原稳态中发挥关键作用。外源施加 GSH 可以提高植物对多种逆境胁迫的耐受性，但关于复合种植下 GSH 在提高林下植物抗寒性方面的研究相对较少。本研究通过分析复合种植模式下林下植物体内谷胱甘肽对抗寒性的作用，表明谷胱甘肽转移酶基因可提高低温胁迫下的 ROS 清除能力，进而增强植物的低温适应性[32]。该研究不仅填补了林下植物抗寒代谢调控领域的空白，还为探究植物种间互作对抗逆性的影响提供了理论依据。

1　材料与方法

1.1　复合种植实验设计

在北京海淀区进行田间实验，本研究设置 4 个实验处理区，3 个月苗龄的木豆单植区共 9 m^2（3 m × 3 m），种植间距为 10 cm；3 个月苗龄的蓝靛果单植区共 9 m^2（3 m × 3 m），种植间距 10 cm；3 个月苗龄的黄芩单植区共 9 m^2（3 m × 3 m），种植间距 10 cm；木豆−蓝靛果−黄芩复合区共 9 m^2（3 m × 3 m），根据黄芩、木豆和蓝靛果占据的生态位及土地利用率最大化原则，按照蓝靛果、黄芩、木豆、黄芩、蓝靛果、黄芩、木豆、黄芩、蓝靛果的顺序复合种植。一个复配单位里将木豆：蓝靛果：黄芩按照 3∶4∶6 的比例进行复配。

1.2　实验材料培养方法

将木豆种子浸泡在清水中 7 d，3 d 换 1 次水，直至长出 3 ~ 5 cm 的根。将生根后的木豆幼苗转移至土壤中（草炭土∶珍珠岩∶蛭石 = 3∶1∶1），放置在人工气候室中生长，并每天喷洒适量 1/1 000 浓度的绿肥，气候室的温度设置为 25 ℃（对照），光周期为 16 h 光照和 8 h 黑暗。生长两周左右，筛选 24 株生长状态相同的幼苗将其放置在 25 ℃、0 ℃（低温胁迫）生长条件下，分别处理 24 h，25 ℃ 处理为对照组。从对照组和实验组获得叶子（3 次生物学重复）。将收集的样品立即置于液氮中并储存在−80 ℃ 超低温冰箱中保存，以作进一步实验。

1.3　转录组及代谢组测序

在百迈克生物公司进行转录组及代谢组测序。通过黄芩和蓝靛果有参转录组（RNA-seq）分析获得 Clean Data，分别将各样品的 Clean Reads 与指定的参考基因组进行序列比对，根据差异倍数（fold change）≥1 且 FDR < 0.01 作为差异基因筛选标准，在设置的各个比较组中，均获得差异表达基因列表。代谢组测序流程包括代谢物提取，加入适量体积提取液和磁珠进行研磨、超声处理，随后静置离心取上清进行上机检测。检测平台为沃特世 Acquity I-Class PLUS 超高效液相串联 AB Sciex Qtrap 6500 + 高灵敏度质谱仪，样本检测按相应参数进行分析。基于自建数据库 GB-PLANT，对样本的代谢物进行了质谱定性定量分析。通过 3 重 4 级杆筛选出每个物质的特征离子，在检测器中获得特征离子的信号强度。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后，对所有物质质谱峰进行峰面积积分，并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正。

1.4　叶片卷曲指数测量

测量了当叶片完全展开时，木豆叶片最宽处边缘之间的距离，以及木豆叶片在自然状态下，同一位置边缘之间的距离。根据 LRI 公式，计算叶片的卷曲程度，统计每组存活的木豆数量和参与实验的每组木豆数量，存活的木豆数量与木豆总数的比值就是存活率。

$$\mathrm{LRI} = (L_w - L_n)/L_w \times 100\% \quad (1)$$

式中：L_w 为最大叶片宽度，L_n 为叶片边缘的自然距离。

1.5 相对含水量和细胞膜透性测量

取对照组和−4 ℃ 下处理 12、24、48 h 的叶片，用蒸馏水清洗叶片，必须擦去叶片上的水分，记录叶片鲜质量为 W_f。然后将叶片浸入蒸馏水中，24 h 后记录叶片质量 W_{fs}(叶片在饱和状态下的质量)。最后，将叶片在 80 ℃ 下干燥 72 h，在室温下自然冷却，并将质量记录为 W_d(叶片干质量)。相对含水量(RWC)采用公式(2)计算。

$$RWC = (W_f - W_d)/(W_{fs} - W_d) \times 100\% \quad (2)$$

称取样品 0.1 g，清水洗净擦干，剪成 1 cm 的小段，置于试管中，加入 25 ml 蒸馏水。封口，室温下摇床上振荡 24 h，振荡结束后，电导仪测电导率 EL_1；试管再次封口，牙签扎孔通气，沸水浴 30 min；温度降到室温时，测电导率 EL_2；测对照 EL_0。用相对电导率(Le)反映细胞膜透性。

$$Le = (EL_1 - EL_0)/(EL_2 - EL_0) \times 100\% \quad (3)$$

1.6 过氧化氢、丙二醛含量测定

为测定 H_2O_2 含量，取蓝靛果叶片 0.1 g，用剪刀剪碎叶片，经液氮冷冻后研磨成粉末状。加入 1 mL 0.1% TCA 溶液进行匀浆化处理，转移至 2 mL 的离心管中。使用相同浓度 TCA 溶液 1 mL 对容器进行冲洗操作。在 4 ℃ 条件下，以转速 15 000 g 离心 15 min 进行离心分离。吸取上清液 1 mL，与 1 mL 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH = 7.0)及需避光保存的 2 mL 1 mol/L 碘化钾溶液混合。

用丙二醛(malondialdehyde，MDA)含量表征脂质过氧化程度，称取蓝靛果叶片 0.05 g，将叶片裁剪成 2 mm 长度，置于研钵内。取适量液氮加入研钵中，持续研磨至粉末状物质形成，随后将粉末转移至 2 mL 离心管中。配置 2 mL 0.25% 浓度的 TBA 溶液加入离心管内，搅拌直至浆液呈现均匀状态。打开离心管盖子，将其放入沸水浴环境中加热 30 min。加热结束后，迅速将离心管转移至冰浴环境进行冷却，以此终止反应。待冷却完成后，将离心管置于转速 10 000 g 的离心力条件下离心 10 min。使用分光光度计在 532、600 nm 下测定各离心管的吸光度。

1.7 抗氧化酶活性测定

首先配置酶提取液，配方为 100 mL PBS(pH = 7.0) + 1 g PVP + 0.007 44 g EDTANa。接下来提取叶片中的酶液，称取 0.15 g 木豆叶片，剪碎后将其置于研钵内，通过持续加入液氮使其充分研磨至粉末状。随后将粉末转移至 2 mL 离心管中，加入 1.5 mL 酶提取液，用移液器吸打混合均匀。在 4 ℃ 条件下，以 15 000 g 离心 20 min，完成后，将上清液转移至新的 2 mL 离心管中，保存在 4 ℃ 冰箱中备用。

为测定抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase，APX)活性，加入 2.82 mL 50 mmol/L PBS(pH = 7.0)，30 μL 50 mmol/L 抗坏血酸，30 μL 10 mmol/L EDTA，100 μL 酶提取液。加盖，混合均匀，加入 30 μL 10 mmol/L H_2O_2 反应开始，测定 290 nm 处 1 min 内吸光度值的变化。

为测定 CAT 活性，加入 2.84 mL 50 mmol/L PBS (pH = 7.0)，30 μL 1.5 mol/L H_2O_2，100 μL 酶液(对照中加 PBS)，加盖、混匀，测定 240 nm 处 1 min 内吸光度变化。

为测定 POD(过氧化物酶)活性，加入 1 mL 50 mmol/L PBS7.0，1 mL 0.3% H_2O_2，0.95 mL 0.2% 愈创木酚，50 μl 酶液(空白加 PBS7.0)。加盖，混匀，测定 470 nm 处 1 min 内吸光度值变化。

为测定 SOD(超氧化物歧化酶)活性，在 60 μL 酶液中，加入 2.82 mL PBS7.8、30 μL130 mmol/L Met、30 μL 10 mmol/L EDTA、30 μl 6.3 mmol/L NBT、60 μL 酶液，对照为磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline，PBS)，最后加入 30 μL 核黄素。加盖、混匀，暗管用黑色布包裹，于温室 25 ℃ 下处理；光强 60 μmol/(m^2·s) 下反应 20 min；光管充分接触灯光，同样条件处理 20 min；反应结束后，检测 560 nm 处吸光度。

1.8 谷胱甘含量及谷胱甘肽 S-转移酶活性测定

木豆和黄芩叶片中的谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活性采用 Abbkine 公司提供的 CheKineTM 谷胱甘肽 S-转移酶检测试剂盒(货号：KTB1630)检测。谷胱甘肽含量采用 Abbkine 公司的还原型谷胱甘肽检测试剂盒(货号：KBT1600)检测。

1.9 RT-qPCR

RNA 提取使用上海普洛麦格生物产品有限公司提供的 Eastep®Super 试剂盒进行，提取的 RNA 利用 All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix 反转录合成 DNA。使用 NanoDrop 8000(Thermo Fisher Scientific)来评估 cDNA 质量。使用 MagicSYBR 混合物(CWBIO，中国北京)在 QuantStudio(TM)6 Flex 系统(BioRad，CA，USA)仪器进行 RT-qPCR 实验。以黄芩 *ACTIN*(F：GATTCTGAGGATTGCCAGATGG R：CCTCCAATCCAGACACTGTACTT)基因为内参基因。每个样品建立 3 个生物学重复，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算转录水平，所有基因的 RT-qPCR 引物如表 1 所示。

1.10 载体构建及瞬时转化

在基因组文件中，找到木豆 *GST*2(LOC109792184)的 CDS 序列，在诺唯赞引物设计网站(https://crm.vazyme.com/cetool/simple.html)设计引物，并检查好引物的特异性。利用设计好的引物扩增基因序列，引物序列见表 2。

表 1　黄芩荧光定量 PCR 引物

Tab. 1　*Scutellaria baicalensis* primers for RT-qPCR

基因	上游引物(5′—3′)	下游引物(3′—5′)
*GST*2	GATCTGCGTCAAGGCTGCTA	TTAAGTCTGAGTGCCACGCC
*GST*3	GGAACGTGGTCTTGCCCATA	TGAAGTCCTGCCAGCTTCTG
*GST*5	GCCCTAGAAATGGCCCAAAT	ACGAAATAGCATTTGAACATAGCA
*GST*6	GGCCTCAACACTTACAGTTCC	ACACAAGTACGACACGATCTTCT
*APX*2	CAGTGACGAGTATCAGCGGG	TCGGAGAGCTTCAAGTGAGC
*APX*3	CAGTGGCCCAGCATCTACAA	GCTCCTCTTGGAAGCTTCGT
*APX*4	GCAAGCTCATGGTGCAAACA	CTCTCTGCCAGGGTGAAAGG
*DHAR*2	GATCTGCGTCAAGGCTGCTA	TTAAGTCTGAGTGCCACGCC

表 2　*GST*2 的 CDS 序列克隆引物

Tab. 2　Cloning primers for CDS sequence of *GST*2

引物	序列
*GST*2-F	ATGGCTCTCGAGGTTGCTGTC
*GST*2-R	TCAAGCATTCACCTTAGGGGC

为了获得过表达目的基因的植物，本研究将目的基因克隆到 pCAMBIA2300 载体中。将重组质粒转化到 GV3101 菌株中。在 10 mL 含有 20 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的 YEP(yeast extract peptone)液体培养基(YRK)中,培养了含有目的基因载体和空载体的 GV3101 细菌。然后,它们在 28 ℃ 下以 180 r/min 的恒定摇动生长 13~15 h。在 OD_{600} 达到 2.0 之后，转移到新的 YRK 液体培养基(100 mL)，在 28 ℃ 下以 180 r/min 的恒定摇动生长 6~8 h。待 OD_{600} 达到 2.0 后，用高速离心机集菌，收集到的菌体放到重悬液中暗培养 2 h。将木豆幼苗放入重悬液中，0.5 MPa 真空渗透 5 min。用无菌水冲洗，并用吸水纸吸干表面水分，将木豆幼苗埋在土中 2~3 d 后，检测基因表达量。

1.11　统计方法

生理指标及表达量分析过程中，差异显著性分析采用 TTEST 检验。统计差异显著性的判定标准为: $p > 0.05$ 表示不显著; $0.01 < p \leqslant 0.05$ 表示显著，标注*; $0.001 < p \leqslant 0.01$ 表示极显著，标注**; $p \leqslant 0.001$ 表示高度极显著，标注***。

2　结果与分析

2.1　代谢组分析复合种植模式下黄芩代谢物含量

将研究材料黄芩、木豆、蓝靛果 3 种林下植物以不同的组合方式,设置成 4 个实验处理区: 分别为 3 个月苗龄的木豆、蓝靛果、黄芩单植区共 9 m^2(3 m × 3 m)，种植间距为 10 cm; 3 个月苗龄的单植区共 9 m^2(3 m × 3 m)，种植间距 10 cm; 3 个月苗龄的单植区共 9 m^2(3 m × 3 m)，种植间距 10 cm。木豆−蓝靛果−黄芩复合区共 9 m^2(3 m × 3 m)，根据木豆、蓝靛果、黄芩 3 种植物的生态位特点，采用分层种植的方式。木豆植株较高，蓝靛果次之，二者可作为上层植物，黄芩植株较矮小，作为下层植物种植在蓝靛果和木豆之间。我们在木豆−蓝靛果−黄芩复合区,按照蓝靛果、黄芩、木豆、黄芩、蓝靛果、黄芩、木豆、黄芩、蓝靛果的顺序复合种植。在一个复配单位里，将木豆∶蓝靛果∶黄芩按照 3∶4∶6 的比例进行复配，从而充分利用不同层次的光照资源，并能提高土地利用率(图 1)。

黄芩是一种重要的药用植物，富含多种活性物质，因此，我们更关注复合种植模式下黄芩代谢物含量变化[33−34]。单独种植和复合种植时，黄芩代谢物的数据分析显示，复合种植显著改变了黄芩中代谢物的含量。根据差异代谢物数据，以代谢物含量≥100，$P \leqslant e^{-10}$ 为标准，共筛选获得 20 种上调代谢物以及 22 种下调代谢物。使用雷达图展示 2 个比较组之间的数据显著差异结果(图 2 A)。Xylostasin(核糖霉素)、5′-Oxoaverantin等多个代谢物下调较为明显，上调代谢物变化倍数相近。在复合种植时，代谢物上调可能是由于响应外界信号，从而使植物能够快速对外界环境改变作出反应，因此，我们主要关注上调的代谢物。通过 $\log_2$(fold change)值，将筛选获得的上调代谢物进行排序，其中，Aflatoxin G2(黄曲霉素 G2)、LysoPC 20:4、Glutathione(谷胱甘肽)位于前 3 位，$\log_2$(fold change)值分别为 2.114 981 963、2.051 789 612、1.963 732 416。通过热图分析单独种植与复合种植的上调代谢物水平差异，结果显示，谷胱甘肽含量变化显著(图 2B)。大量研究表明[33]，谷胱甘肽是一种重要的非酶抗氧化剂，可以由还原型谷胱甘肽转化为氧化型谷胱甘肽，直接清除 ROS，并作为 GST 的底物参与解除氧化毒性(图 2C)。它和抗坏血酸(维生素 C)组成的 AsA-GSH 循环能够

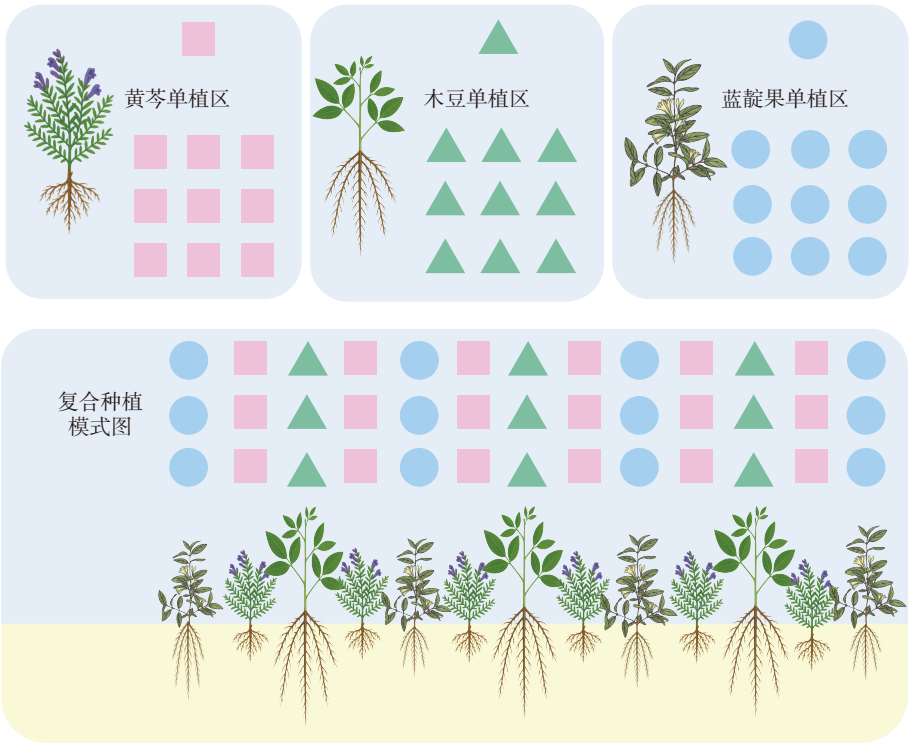


图 1 单一种植及复合种植模式图

Fig. 1 Diagram of monoculture and intercropping patterns

有效地清除自由基，保护植物免受氧化损伤。由此可见，谷胱甘肽在植物抵御胁迫中发挥着至关重要的作用。

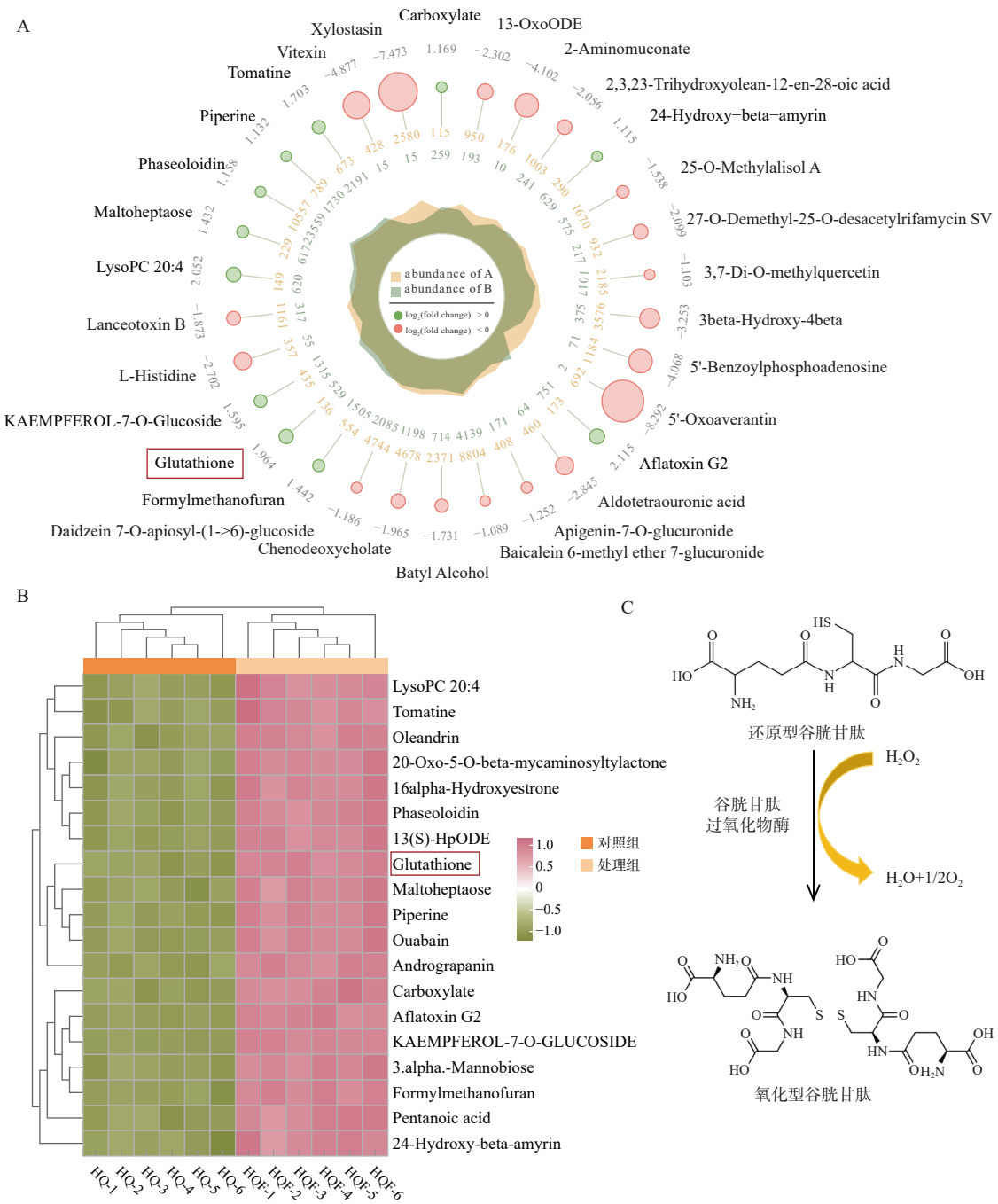
2.2 黄芩在复合种植条件下 ASA-谷胱甘肽通路基因的低温响应分析

复合种植模式下，黄芩中 ASA-谷胱甘肽通路基因是否会发生变化。根据黄芩表达模式数据，以 FPKM 值 ≥ 1、$|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 为筛选标准，筛选差异表达基因。在 NCBI 上下载谷胱甘肽代谢通路蛋白序列，通过 TB-tools 软件，在黄芩基因组中同源比对。进一步筛选了注释为“谷胱甘肽转移酶（GST）”、“脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）”、“抗坏血酸过氧化物酶（APX）”的基因，根据其在染色体上的位置进行命名，并绘制基因表达量热图。在筛选获得的差异表达 ASA-GSH 代谢通路基因中，*GST*2、*GST*3、*GST*5、*GST*6、*GST*10、*DHAR*2、*APX*2、*APX*3、*APX*4 基因显著上调表达，*GST*1、*GST*4、*GST*7、*GST*8、*GST*9、*GST*11、*DHAR*1 基因显著下调表达，表明这些 ASA-谷胱甘肽途径基因在复合种植时，能对外界信号做出响应（图 3A）。有研究表明[33]，植物在受到胁迫时，体内活性氧爆发，激活 ASA-谷胱甘肽系统。首先，抗坏血酸过氧化物酶（APX）利用抗坏血酸（ASA），将 H_2O_2 还原为 H_2O，同时生成单脱氢抗坏血酸（MDHA）。随后，MDHA 还原酶（MDHAR）利用 NADPH，将 MDHA 还原为 ASA，维持 ASA 库的稳定。此外，谷胱甘肽还原酶（GR）利用 NADPH，将氧化型谷胱甘肽（GSSG）还原为还原型谷胱甘肽（GSH），维持 GSH/GSSG 比值。GSH 不仅可以作为 APX 的底物，直接参与 H_2O_2 的清除，还可以与 ROS 反应生成 GSSG，进一步减轻氧化损伤。通过 ASA-谷胱甘肽通路的协同作用，植物能够有效清除 ROS，维持细胞氧化还原平衡，从而提高对胁迫的耐受性（图 3 B）。

低温是影响林下植物的一种重要的非生物胁迫，我们通过荧光定量 PCR，检测了低温条件下黄芩 ASA-谷胱甘肽通路中基因的表达量变化。在低温处理下，*GST*2、*GST*3、*GST*5、*GST*6、*DHAR*2、*APX*2、*APX*3、*APX*4 基因表达量相比于对照组，分别上调了 6.33、4.48、1.25、2.30、3.83、2.88、2.14、6.30 倍，其中，*GST*2 表达量变化最明显（图 3C）。结果显示，复合种植模式下，ASA-谷胱甘肽通路基因表达量变化显著，并且能响应低温胁迫。此外，我们初步认为，*GST*2 在林下植物抵御低温胁迫过程中发挥了更重要的作用。

2.3 转录组分析复合种植下蓝靛果 ASA-谷胱甘肽通路基因表达量

接着，检测了蓝靛果在单一和复合种植条件下 ASA-谷胱甘肽通路基因表达量。以 FPKM 值≥1、$|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 为筛选标准，筛选了注释为“谷胱甘肽转移酶（GST）”的差异表达基因。在筛选获得的差异表达 ASA-GSH 代谢通路基因中，*evm.TU.Chr*01.548、*evm.TU.Chr*01.3959、*evm.TU.Chr*01.



A. 差异代谢物动态雷达图。最外层圈表示差异表达代谢物，绿色代表上调、红色代表下调，圈的大小根据$\log_2$（fold change）值的大小而变化。第2层外圈数据代表单独种植的平均表达量，内圈数据代表复合种植的平均表达量。B. 单独种植和复合种植时黄芩上调代谢物热图，HQ为黄芩单独种植，HQF为黄芩复合种植。C. 谷胱甘肽转化过程。

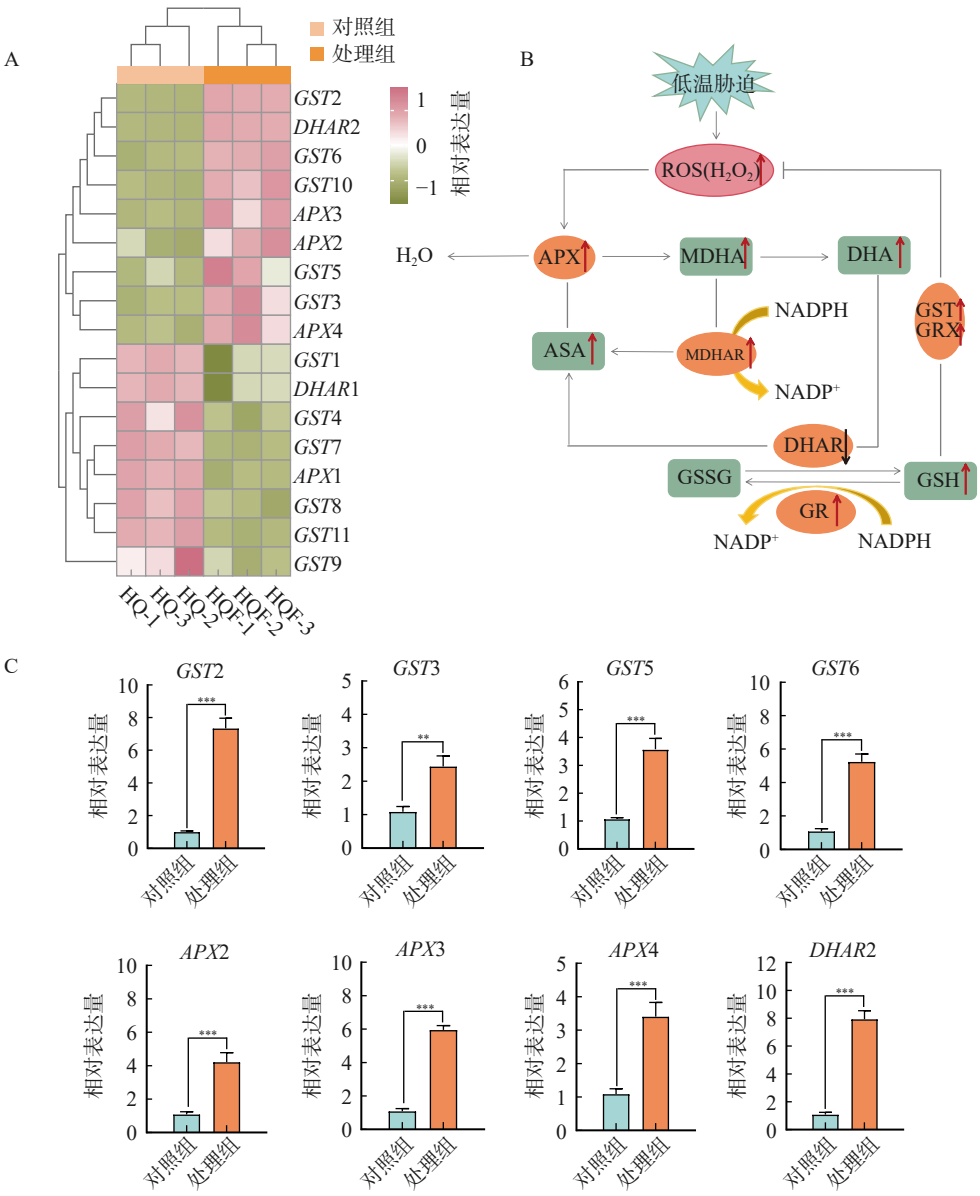
图 2　单一种植及复合种植模式下黄芩代谢产物的差异性分析

Fig. 2　Differential analysis of metabolites of *Scutellaria baicalensis* under monoculture and intercropping patterns

3960、*evm.TU.Chr*07.2466、*evm.TU.Chr*09.1577、*evm.TU.Chr*01.3962、*evm.TU.Chr*09.2907 基因显著上调表达，*evm.TU.Chr*01.3126 基因显著下调表达。表明蓝靛果中，这些 ASA-谷胱甘肽途径基因在复合种植时能对外界信号做出响应(图 4)。这些结果与黄芩中的结果相似，说明复合种植能够使 ASA-谷胱甘肽通路基因做出响应，谷胱甘肽转移酶基因使谷胱甘肽的含量增加，从而能够使植物有效清除 ROS，维持细胞氧化还原平衡，从而提高对胁迫的耐受性。

2.4　复合种植模式使 3 种林下植物对低温耐受性增强

基于上述分析，复合种植促进林下植物中谷胱甘肽水平提高，并且相关基因表达量显著增加，能够响应低温胁迫。接下来比较 2 种种植模式下，林下植物对低温胁迫的抗性。测定正常条件下生长以及低温处理的黄芩、木豆、蓝靛果中，H_2O_2、GST 活性和 GSH 的含量发现，复合种植相比于单独种植，3 种植物对于低温胁迫的抵抗能力均有提高。在蓝靛



HQ为黄芩单独种植，HQF为黄芩复合种植。A. 谷胱甘肽代谢途径的酶基因热图，从绿色到红色表示基因表达量增加。B. 低温胁迫下ASA-谷胱甘肽通路表达调控模式。C. RT-qPCR检测ASA-谷胱甘肽代谢通路基因在0 ℃低温下处理24 h的表达水平。**表示在$0.001 < p \leqslant 0.01$水平上差异极显著；***表示在$p \leqslant 0.001$水平上差异高度极显著。下同。

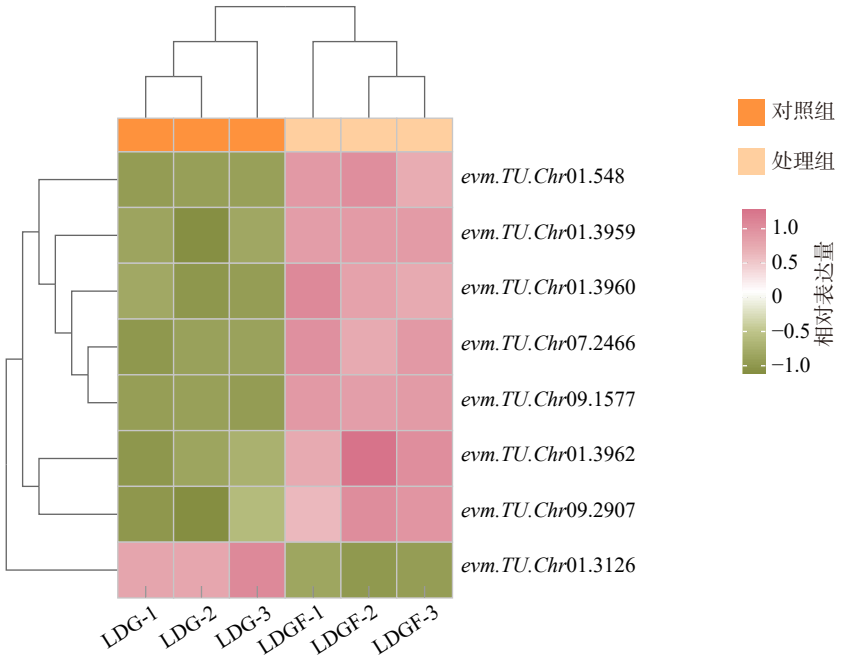
图 3 低温胁迫下黄芩 ASA-谷胱甘肽代谢通路基因表达量

Fig. 3 Expression levels of ASA-glutathione metabolism pathway genes under low-temperature stress of *Scutellaria baicalensis*

果、木豆、黄芩中，低温处理后，复合种植相比于单独种植，H_2O_2 含量分别降低了 16.04%、38.98%、10.10%，谷胱甘肽含量分别提高了 7.63%、13.4%、8.85%，GST 活性分别提高了 1.81、5.37 和 3.13 倍（图 5）。在低温胁迫下，相比于单独种植，复合种植的蓝靛果、木豆和黄芩体内，H_2O_2 分别有不同程度的下降，GSH 含量和 GST 活性有不同程度的提高。上述结果说明，复合种植使植物体内抗氧化酶活性增强，抗氧化物质含量增加，降低了低温胁迫下的活性氧爆发程度，增强了林下植物对寒冷的耐受性。因此我们预测，复合种植的林下植物可能通过谷胱甘肽途径，缓解在低温胁迫下受到的损伤。

2.5 外源喷施谷胱甘肽能使木豆对低温胁迫耐受性增强

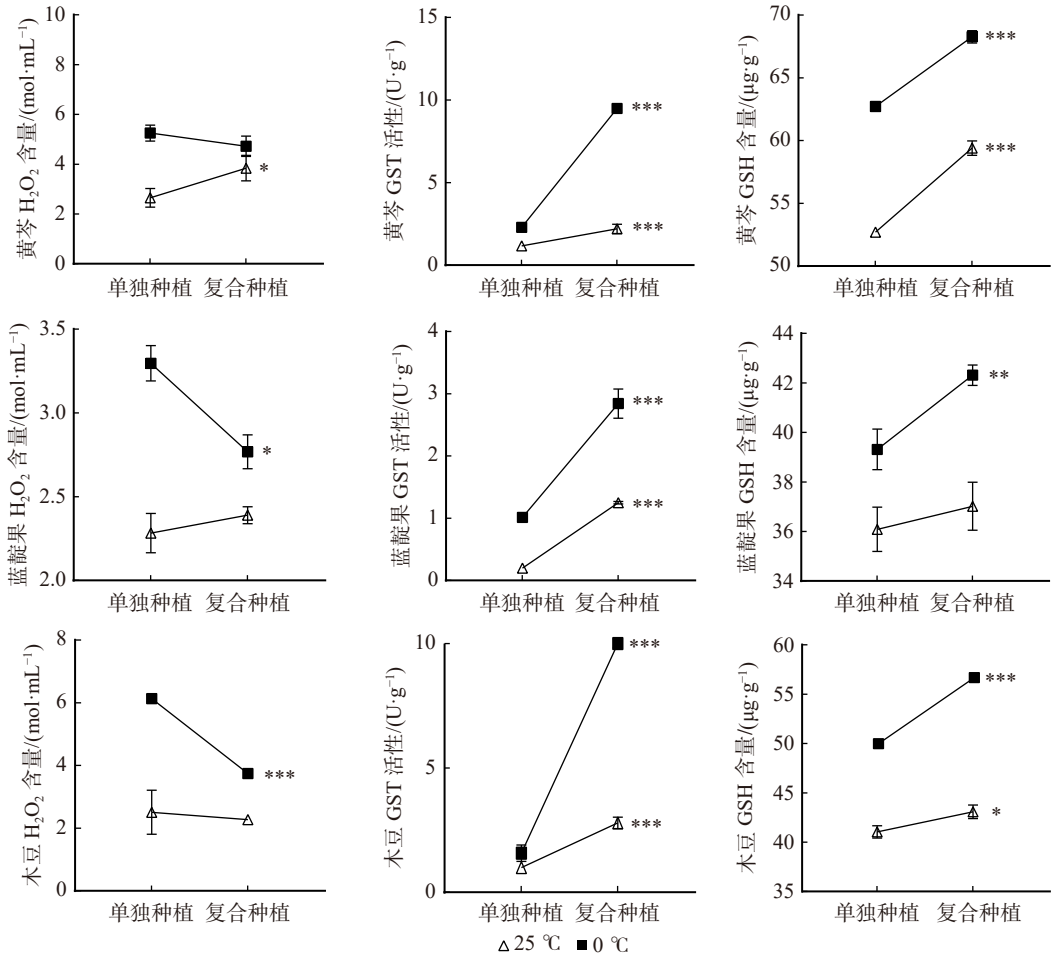
通过林下植物复合种植代谢物及抗寒性分析，我们预测谷胱甘肽对林下植物抗寒性发挥着重要作用。由于黄芩和蓝靛果均属于适应北方种植环境的物种，具备较强的抗寒能力，而木豆主要自然分布区域集中在热带、亚热带地区，抗寒能力较弱[35−38]。因此，本研究检测了复合种植下产生的谷胱甘肽是否能提高木豆的抗寒性。以林下植物木豆为研究材料，探究喷施谷胱甘肽对木豆抗寒性的影响。通过观察表型，发现 0 ℃ 低温处理后，木豆叶片出现不同程度的皱缩，在喷施谷胱甘肽后，叶片受损伤程度明显



LDG 为蓝靛果单独种植，LDGF 为蓝靛果复合种植。

图 4　2 种种植模式下蓝靛果 ASA-谷胱甘肽代谢通路基因表达量

Fig. 4　Expression levels of genes in ASA-glutathione metabolic pathway of honeyberry under 2 planting patterns



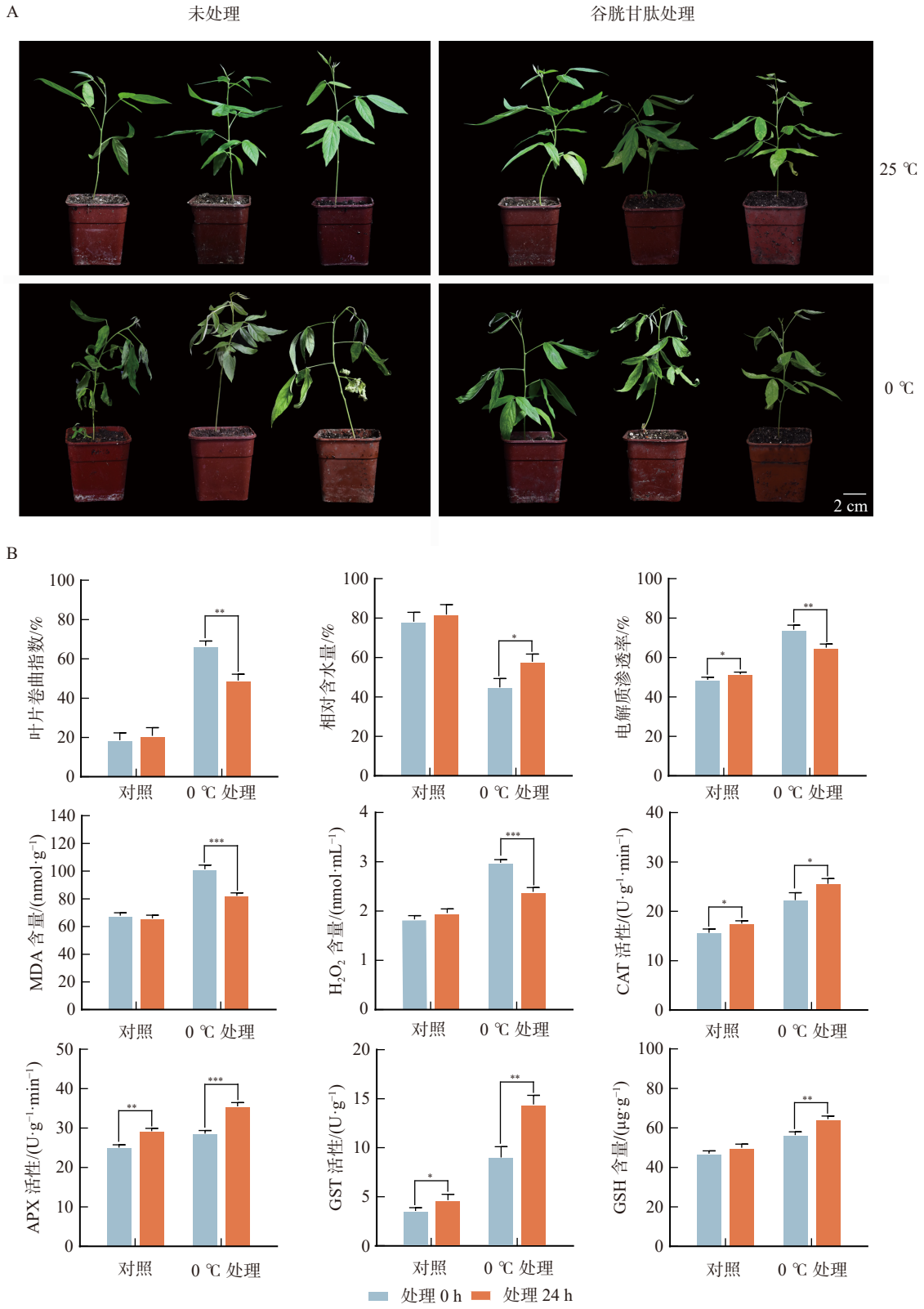
*表示在0.01 < p ≤ 0.05水平上差异显著。下同。

图 5　不同物种在 2 种种植模式下 GST 活性、H_2O_2 及 GSH 含量变化

Fig. 5 Changes in GST activity and H_2O_2 as well as GSH contents in different species under 2 planting patterns

减弱(图 6A)。

我们测量了木豆叶片的卷曲指数、相对含水量、电解质渗透率和 MDA 含量。在 0 ℃ 处理下，喷施谷胱甘肽比未喷施谷胱甘肽叶片卷曲指数下降了 26.48%。正常条件生长的木豆相对含水量为 78.18%，喷施谷胱甘肽后，相对含水量为 81.76%；0 ℃ 处理



A. 木豆在25 ℃、0 ℃条件下处理24 h后叶片表型变化；B. 木豆在25 ℃、0 ℃条件下处理24 h后叶片卷曲指数、相对含水量、电解质渗透率、MDA含量、H2O2含量、CAT活性、APX酶活性、GST活性及GSH含量。

图 6 喷施及未喷施谷胱甘肽的木豆在低温处理下表型及生理指标

Fig. 6 Phenotypic and physiological indices of pigeonpea sprayed with glutathione and unsprayed one under low-temperature stress

的木豆相对含水量为 44.84%，喷施谷胱甘肽后，相对含水量为 57.91%。在低温胁迫下，木豆叶片的相对含水量显著降低。在 0 ℃ 处理下，喷施谷胱甘肽的木豆比 CK 相对含水量提高了 29.14%。在正常生长条件下，木豆的电导率为 48.70%，喷施谷胱甘肽后电导率为 51.50%；0 ℃ 处理的木豆电导率为 74.12%，喷施谷胱甘肽后电导率为 65.02%。在 0 ℃ 处理下，喷施谷胱甘肽的木豆比 CK 电导率下降了 12.28%。这些发现表明，长时间低温胁迫使木豆叶片受到损伤，叶片含水量下降，细胞膜透性增加，严重影响木豆生长发育，而谷胱甘肽处理能够缓解植物低温受到的损伤。在正常生长条件下，木豆的 MDA 含量为 67.80 nmol/g，喷施谷胱甘肽后 MDA 含量为 65.91 nmol/g。0 ℃ 处理后，MDA 含量为 101.38 nmol/g，喷施谷胱甘肽后变为 82.15 nmol/g。在 0 ℃ 处理下，喷施谷胱甘肽的木豆比未喷施谷胱甘肽的 MDA 含量下降了 23.4%（图 6B），说明喷施谷胱甘肽有助于缓解低温诱导的膜损伤，有助于植物抵御外界胁迫。

为了进一步了解谷胱甘肽是否参与低温胁迫下木豆抗氧化系统的调控过程，我们测量了木豆叶片的 H_2O_2 含量和抗氧化酶活性。在 0 ℃ 处理下，喷施谷胱甘肽的木豆比未喷施谷胱甘肽的 H_2O_2 含量下降了 19.89%，CAT 酶活性提高了 14.81%，APX 酶活性提高了 24.18%，GST 酶活性提高了 14.24%，GSH 含量提高了 37.48%（图 6B）。由此可见，喷施谷胱甘肽能够激活低温下木豆的抗氧化系统，提高抗氧化酶活性，抑制活性氧的过量产生，从而保护植物免受氧化损伤。

2.6　过表达 *GST*2 显著提高了木豆对低温胁迫的耐受性

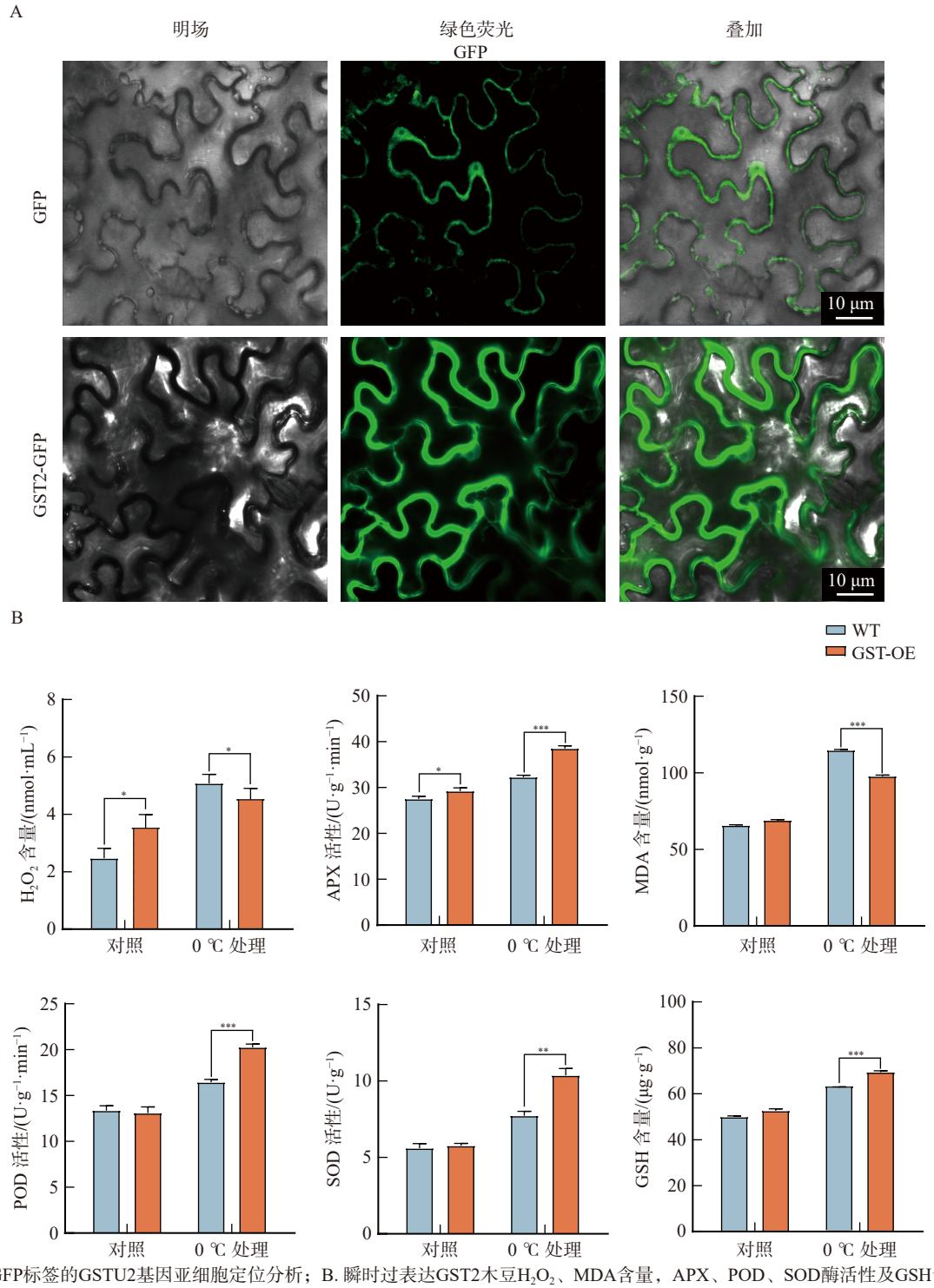
为了确定 *GST*2 基因的亚细胞定位，将木豆 *GST*2 的 cDNA 在 CaMV 35S 启动子驱动下与 *GFP* 基因融合，构建过表达载体。然后，通过农杆菌介导的瞬时转化在本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）叶片中表达 35S：*GST*2-GFP 融合构建体或 35S：GFP 空载体。融合构建体的共聚焦显微镜观察显示，GST2 蛋白的 GFP 信号定位在细胞质和细胞核中。结果表明，GST2 蛋白定位在细胞质和细胞核中（图 7A）。

为了验证 *GST*2 是否可以调控木豆对低温胁迫的抗性，我们构建 p35S: *GST*2-GFP 过表达载体，利用瞬时转化体系分析了 *GST* 在调控低温胁迫下调节活性氧平衡的功能。过表达 *GST*2 基因的木豆叶片在 0 ℃ 下处理 24 h 的表型相比于对照组有明显恢复。在 0 ℃ 下处理，过表达 *GST*2 木豆相比于对照组 H_2O_2 及 MDA 含量显著降低、抗氧化酶活性显著提高（图 7B）。与 CK 相比，过表达 *GST* 的木豆在 0 ℃ 处理下，H_2O_2 和 MDA 含量分别下降了 10.10%、14.73%。APX、SOD、POD 酶活性分别提高了 19.37%、34.05%、23.18%，GSH 含量提高了 10.68%。这些结果表明，*GST*2 基因参与低温诱导的氧化损伤，抗氧化系统被激活，增强了木豆叶片的抗氧化防御能力。*GST*2 通过提高 APX、SOD 和 POD 等抗氧化酶活性以增加活性氧清除能力，从而提高对低温胁迫的耐受性。

3　讨　　论

林下植物复合种植是一种人工生态经济复合系统，具有投入小、见效快的经济特点。目前，林药复合经营模式、林蔬复合经营模式、大豆玉米带状复合种植、杨树林间复合种植模式是比较成熟的林下经济发展模式，对于提高种植效益、提高森林生产力与生态效益具有重要意义[37−38]。低温胁迫会抑制林下植物的光合作用、呼吸作用和养分吸收，导致生长缓慢或停滞[39]。低温诱导的 ROS 需被及时清除以避免氧化损伤，植物依赖各种抗氧化酶维持氧化还原平衡，SOD 能将超氧阴离子自由基转化为过氧化氢，而 CAT、POD 和 APX 则进一步将过氧化氢分解为水和氧气，这些酶活性的协同提升构成了一个高效的活性氧清除网络，有效降低了活性氧在植物体内的积累。在复合种植模式下，植物会产生大量的谷胱甘肽。在低温胁迫时，植物体内活性氧生成加速，导致膜脂过氧化，丙二醛（MDA）含量升高，严重损害细胞结构和功能[40]。研究结果显示，复合种植抑制了低温处理下 H_2O_2 的过量产生，显著提高了谷胱甘肽含量及谷胱甘肽转移酶活性，有助于促进林下植物抵御低温胁迫。低温胁迫下，经谷胱甘肽处理的林下植物体内超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、过氧化物酶（POD）和抗坏血酸过氧化物酶（APX）等抗氧化酶活性显著增强。

抗坏血酸–谷胱甘肽（ASA - GSH）循环是植物抗氧化防御系统的重要组成部分，由多种抗氧化酶和非酶物质组成，包括抗坏血酸过氧化物酶（APX）、脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）、单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）和谷胱甘肽还原酶（GR）等。它们共同协作，将活性氧转化为无毒物质，从而维持细胞内的氧化还原平衡。在该循环中，APX 利用 ASA 将 H_2O_2 还原为 H_2O，自身被氧化为单脱氢抗坏血酸，随后单脱氢抗坏血酸在单脱氢抗坏血酸还原酶作用下还原为 ASA，同时，GSH 参与维持该过程的氧化还原平衡[38-39]。本研究发现，GSH 处理显著降低了低温胁迫时林下植物体内过氧化氢（H_2O_2）含量和



A. 带GFP标签的GSTU2基因亚细胞定位分析；B. 瞬时过表达GST2木豆H_2O_2、MDA含量，APX、POD、SOD酶活性及GSH含量。

图 7 *GST2* 过表达通过促进活性氧清除提高木豆耐寒性

Fig. 7 Overexpression of *GST2* enhances cold resistance of pigeonpea by promoting clearance of reactive oxygen species

MDA 水平。这意味着 GSH 有效抑制了活性氧的爆发以及由此引发的膜脂过氧化过程。GSH 处理还促进了抗氧化酶（APX、CAT、POD、SOD）活性增强。这与前人[33]在其他植物上的研究结果相符，如在小麦（*Triticum aestivum*）和番茄（*Solanum lycopersicum*）中的研究表明，外源 GSH 能够诱导抗氧化酶基因的表达，进而提升酶活性。GSH 可能作为信号分子，激活了相关基因的转录和翻译过程，使得这些关键抗氧化酶的合成增加。在番茄中，*SlSBPASE* 的突变通过损害谷胱甘肽生物合成和抑制植物中抗坏血酸–谷胱甘肽的再循环来加剧低温诱导的氧化应激。赖氨酸 220 位点谷胱甘肽过氧化物酶的赖氨酸去巴豆酰化提高谷胱甘肽过氧化物酶活性，能够增强菊花抵抗冷胁迫的能力[30]。在茶树（*Camellia sinensis*）中，*CsGST* 可以对低温在内的多种胁迫做出反应[28]。GSH 一方面直接参与活性氧的清除反应，另一方面，

通过调节抗氧化酶系统间接发挥作用，从而维持了细胞内活性氧的动态平衡，减轻了膜系统的损伤，保持了细胞膜的稳定性和完整性，使植物在低温环境下能更好地维持正常生理功能。GSH 含量的增加以及 *GST* 基因的过表达有助于维持 ASA - GSH 循环的高效运转，增强植物对活性氧的清除能力，进一步提升植物的抗寒性能。

ICE-CBF/DREB-COR 级联通路是植物响应低温胁迫的关键信号转导途径。低温信号首先激活 *ICE*1 转录因子，进而诱导 *CBF*/*DREB*1 转录因子的表达。*CBF*/*DREB*1 作为转录激活因子，能够结合下游 *COR* 基因的启动子区域，调控其表达。*COR* 基因编码的蛋白质具有多种功能，包括保护细胞膜、稳定蛋白质结构和调节渗透压等，共同提高植物的抗寒性。*ICE* 作为该级联通路的上游关键调控因子，能够感知低温信号并激活 *CBF* 基因的表达。研究表明，*MdNAC*104 通过 *CBF* 依赖和 *CBF* 独立途径正向调节苹果（*Malus domestica*）的耐寒性[41]。*TaMPK*3 过表达通过增加拟南芥中 *ICE-CBF-COR* 相关基因的表达增强抗冻能力[26]。谷胱甘肽通过维持细胞内的氧化还原平衡，稳定 ICE 蛋白的结构与功能。GSH 不仅作为抗氧化剂，还可能通过硫醇化修饰（S-glutathionylation）调控冷信号相关蛋白的活性。在茶树上，抗坏血酸–谷胱甘肽（AsA-GSH）通路和 *CsGSTU*7 通过维持氧化还原稳态来增强抗寒性[20]。谷胱甘肽强大的抗氧化能力能够及时清除过量的活性氧，保护 ICE 蛋白免受氧化损伤，从而确保其能正常响应低温信号，启动下游调控。整个 ICE-CBF/DREB-COR 级联通路的有效运行依赖于细胞内稳定的内环境。谷胱甘肽调节抗氧化系统，防止活性氧对细胞内各种生物大分子和膜系统的损伤，维持细胞内离子平衡和信号转导的正常进行，为该级联通路各环节的信号传递提供稳定保障。

此外，植物激素在介导植物对寒冷胁迫的防御反应中也起着重要作用。GSH 可能通过调节钙信号或激素（如 ABA、JA）途径，间接影响冷响应基因的表达。在草莓（*Fragaria ananassa*）中，低温可以通过提高内源性 ABA 含量来诱导脱落酸（ABA）生物合成基因的表达，增强植物的耐寒性[23]。冷胁迫也会导致内源性水杨酸（SA）的积累，外源性 SA 处理显著提高了玉米（*Zea mays*）的耐寒性[24]。此外，茉莉酸（JA）通过充当正调节剂参与对寒冷应激的反应[7]。

本研究揭示了谷胱甘肽（GSH）及 *GST* 基因通过调节抗氧化系统促进清除活性氧（ROS），进而提高林下植物抗寒性，为进一步林下植物抗冷的分子机制研究提供了潜在靶点（图 8）。该研究不仅丰富了植物抗寒理论，也为利用 GSH 提高林下植物抗寒性提供了理论依据，对培育抗寒性强的林下植物品种、

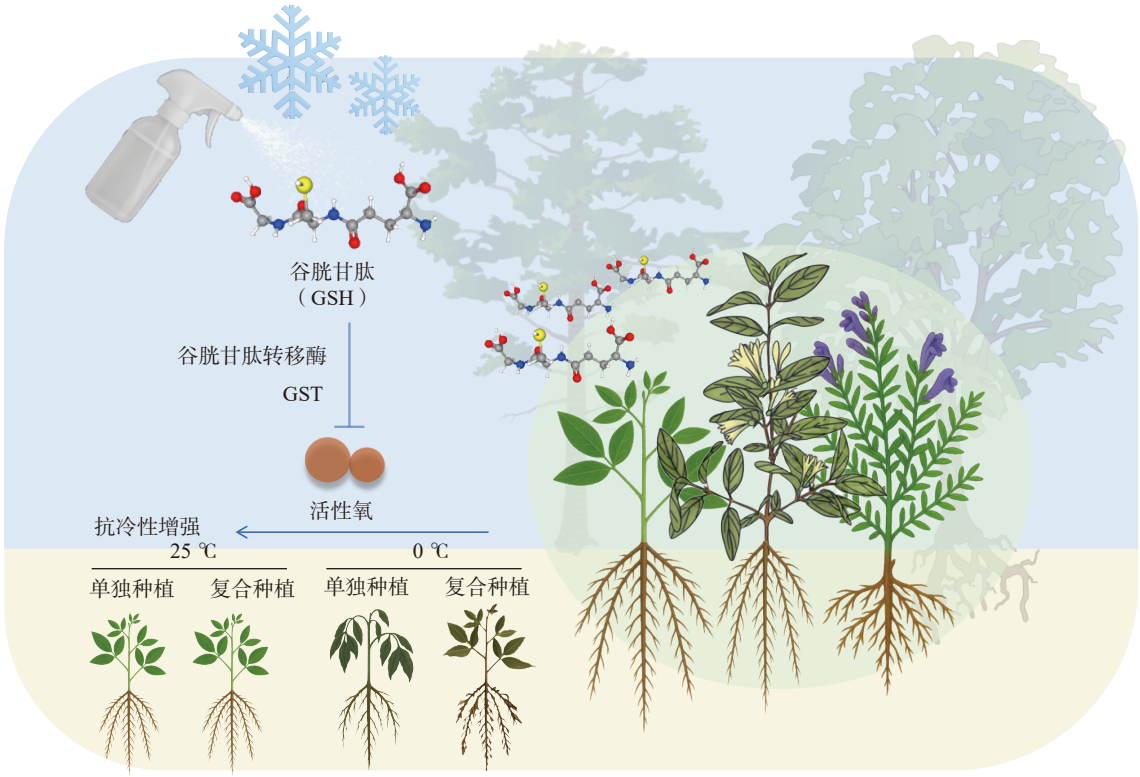


图 8　谷胱甘肽（GSH）及 *GST2* 基因促进清除活性氧提高林下植物抗寒性

Fig. 8　Glutathione (GSH) and *GST2* genes promoting clearance of ROS to enhance cold resistance of understory plants

维持森林生态系统稳定具有重要意义。

4 结　　论

基于木豆、蓝靛果和黄芩的生态位差异的复合模式，能有效提高土地利用率和光照资源的利用效率。转录组与代谢组学分析表明，复合种植显著提升了林下植物的谷胱甘肽水平，增强了谷胱甘肽转移酶基因等的表达量，荧光定量证实，黄芩中 ASA-谷胱甘肽通路基因表达量显著提高，说明复合种植能使植物有效响应低温胁迫。对比复合种植与单独种植模式下植物对低温胁迫的抗性，复合种植显著降低了蓝靛果、木豆、黄芩中的 H_2O_2 含量，提高了谷胱甘肽含量和 GST 活性。针对不耐寒的木豆进行的进一步研究显示，喷施谷胱甘肽可激活其抗氧化系统，清除过量活性氧，减轻叶片损伤。而过表达 *GST*2 基因的木豆在低温处理下，H_2O_2 和 MDA 含量降低，GSH 含量提高，多种抗氧化酶活性显著增强，表明 *GST*2 基因参与了低温诱导的氧化损伤过程，增强了叶片的抗氧化防御能力。综上所述，复合种植下产生的谷胱甘肽以及 *GST*2 能够通过调节林下植物的抗氧化系统，及时有效地清除活性氧，降低氧化应激对植物细胞的伤害，维持细胞正常的生理功能和结构稳定性，进而显著提高林下植物的抗寒性，为林下植物资源的保护和利用提供了新的思路和方法。

参 考 文 献

[1] Becker R, Szakiel A. Phytochemical characteristics and potential therapeutic properties of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) (Caprifoliaceae) [J]. Journal of Herbal Medicine, 2019, 16: 100237.

[2] Chanda V S K, Rao N V P R, Saxena R K, et al. Pigeonpea improvement: an amalgam of breeding and genomic research [J]. Plant Breeding, 2019, 138: 445−454.

[3] 谢京湘, 于汝元, 胡涌. 农林复合生态系统研究概述 [J]. 北京林业大学学报, 1988, 10(1): 104−108.
Xie J X, Yu R Y, Hu Y. Overview of Research on Agroforestry Ecosystems [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1988, 10(1): 104−108.

[4] 陈雪, 胡海波, 李锦侦, 等. 我国林蔬复合经营模式与技术研究综述 [J]. 辽宁林业科技, 2023(5): 41−46.
Chen X, Hu H B, Li J Z, et al. A review of research on models and technologies of forest-vegetable compound management in China [J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 2023(5): 41−46.

[5] 李颖, 杨宁, 李开宇, 等. 农林 (草) 复合种植阻控坡地水土流失研究进展 [J]. 辽宁林业科技, 2022(2): 54−58.
Li Y, Yang N, Li K Y, et al. Research progress on slope soil and water loss control by agro-forestry (grass) compound planting [J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 2022(2): 54−58.

[6] 林时平. 林下中药材复合种植模式探讨 [J]. 广东蚕业, 2021, 55(5): 25−26.
Lin S P. Discussion on compound planting modes of Chinese medicinal materials under forest [J]. Guangdong Sericulture, 2021, 55(5): 25−26.

[7] 卢潇楠. 杨树林间复合种植模式 [J]. 现代农村科技, 2025(5): 67−68.
Lu X N. Compound planting modes in poplar forests [J]. Modern Rural Science and Technology, 2025(5): 67−68.

[8] 田丰铭, 佘瑞宁, 陈博威, 等. 林下中药材种植与应用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(6): 64−71.
Tian F M, She R N, Chen B W, et al. Research progress on planting and application of Chinese medicinal materials under forest [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2022, 41(6): 64−71.

[9] 王庆国, 张学鹏, 林松明, 等. 不同株高玉米配置对玉豆复合种植模式下玉米光合特性及产量的影响 [J]. 山东农业科学, 2025(9): 1−17.
Wang Q G, Zhang X P, Lin S M, et al. Effects of different maize plant height configurations on photosynthetic characteristics and yield of maize under maize-bean compound planting mode [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2025(9): 1−17.

[10] 王冉, 王玥, 谭锦豪, 等. 林药复合系统研究进展 [J]. 林业与环境科学, 2019, 35(4): 128−131.
Wang R, Wang Y, Tan J H, et al. Research progress on forest-medicine compound systems [J]. Forestry and Environmental Science, 2019, 35(4): 128−131.

[11] 雍太文, 杨文钰. 玉米大豆带状复合种植技术的优势、成效及发展建议 [J]. 中国农民合作社, 2022(3): 20−22.
Yong T W, Yang W Y. Advantages, effects and development suggestions of maize-soybean strip compound planting technology [J]. China Farmers' Cooperatives, 2022(3): 20−22.

[12] 赵雅娴. 浅析林下中药材复合种植模式 [J]. 河南农业, 2021(4): 17.
Zhao Y X. Brief analysis of compound planting modes of Chinese medicinal materials under forest [J]. Henan Agriculture, 2021(4): 17.

[13] Bhat K A, Mahajan R, Pakhtoon M M, et al. Low temperature stress tolerance: an insight into the omics approaches for legume crops [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 888710.

[14] Cao Q, Lü W, Jiang H, et al. Genome-wide identification of glutathione S-transferase gene family members in tea plant (*Camellia sinensis*) and their response to environmental stress [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 205: 749−760.

[15] Chen X, Zhou N, Yu L, et al. Plant resistance inducer AMHA enhances antioxidant capacities to promote cold tolerance by regulating the upgrade of glutathione S-transferase in tea plant [J]. Horticulture Research, 2025, 12(6): uhaf073.

[16] 张子璇, 孟晓倩, 张新娜, 等. 林下植被叶际微生物群落对生活型与光照的响应 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(9): 67−79.
Zhang Z X, Meng X Q, Zhang X N, et al. Responses of

phyllosphere microbial communities in understory vegetation to plantlife form and light intensity [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9): 67−79.

[17] Cheng Z, Bao Y, Li Z, et al. *Lonicera caerulea* (Haskap berries): a review of development traceability, functional value, product development status, future opportunities, and challenges [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(27): 8992−9016.

[18] 林善枝, 张志毅. 低温诱导植物抗寒冻性研究与毛白杨抗冻性改良策略 [J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(6): 89−94.
Lin S Z, Zhang Z Y. Research on low-temperature-induced chilling-and-freezing tolerance of plants and strategies for improvement of *Populus tomentosa* freezing tolerance [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(6): 89−94.

[19] Ding Y, Li H, Zhang X, et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in arabidopsis [J]. Developmental Cell, 2015, 32(3): 278−289.

[20] Dong C H, Agarwal M, Zhang Y, et al. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(21): 8281−8286.

[21] Dorion S, Ouellet J C, Rivoal J. Glutathione metabolism in plants under stress: beyond reactive oxygen species detoxification [J]. Metabolites, 2021, 11(9): 641.

[22] Farooq M A, Niazi A K, Akhtar J, et al. Acquiring control: the evolution of ROS-induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 141: 353−369.

[23] Gusain S, Joshi S, Joshi R. Sensing, signalling, and regulatory mechanism of cold-stress tolerance in plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 197: 107646.

[24] Horvath E, Kulman K, Tompa B, et al. Glutathione transferases are involved in the genotype-specific salt-stress response of tomato plants [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(9): 1682.

[25] Hu Y, Wu Q, Sprague S A, et al. Tomato expressing arabidopsis glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components [J]. Horticulture Research, 2015, 2: 15051.

[26] Islam F, Khan M, Ahmed S, et al. OsLPXC negatively regulates tolerance to cold stress via modulating oxidative stress, antioxidant defense and JA accumulation in rice [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2023, 199: 2−16.

[27] Li H, Ding Y, Shi Y, et al. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in arabidopsis [J]. Developmental Cell, 2017, 43(5): 630−642.

[28] Mei C, Yang J, Mei Q, et al. MdNAC104 positively regulates apple cold tolerance via CBF-dependent and CBF-independent pathways [J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(10): 2057−2073.

[29] Mittler R, Zandalinas S I, Fichman Y, et al. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(10): 663−679.

[30] Noctor G, Cohen M, Tremulot L, et al. Glutathione: a key modulator of plant defence and metabolism through multiple mechanisms [J]. Journal of Experimental Botany, 2024, 75(15): 4549−4572.

[31] Rai G K, Kumar P, Choudhary S M, et al. Antioxidant potential of glutathione and crosstalk with phytohormones in enhancing abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plants (Basel), 2023, 12(5): 1133.

[32] Shen J, Liu J, Yuan Y, et al. The mechanism of abscisic acid regulation of wild Fragaria species in response to cold stress [J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 670.

[33] Wang M, Ding F, Zhang S. Mutation of SlSBPASE aggravates chilling-induced oxidative stress by impairing glutathione biosynthesis and suppressing ascorbate-glutathione recycling in tomato plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 565701.

[34] Wang R, Yu M, Zhao X, et al. Overexpression of *TaMPK3* enhances freezing tolerance by increasing the expression of ICE-CBF-COR related genes in the *Arabidopsis thaliana* [J]. Functional Plant Biology, 2024, 51(5): FP23144.

[35] Wang Y, Samarina L, Mallano A I, et al. Recent progress and perspectives on physiological and molecular mechanisms underlying cold tolerance of tea plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1145609.

[36] Xia X J, Chen Z, Yu J Q. ROS mediate brassinosteroids-induced plant stress responses [J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(5): 532−534.

[37] Yang L, Sun Q, Geng B, et al. Jasmonate biosynthesis enzyme allene oxide cyclase 2 mediates cold tolerance and pathogen resistance [J]. Plant Physiology, 2023, 193(2): 1621−1634.

[38] Yang X, Lin P, Luo Y, et al. Lysine decrotonylation of glutathione peroxidase at lysine 220 site increases glutathione peroxidase activity to resist cold stress in chrysanthemum [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 232: 113295.

[39] Zhang Z, Li J, Li F, et al. OsMAPK3 phosphorylates OsbHLH002/OsICE1 and inhibits its ubiquitination to activate OsTPP1 and enhances rice chilling tolerance [J]. Developmental Cell, 2017, 43(6): 731−743.

[40] Zhao C, Wang P, Si T, et al. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability [J]. Developmental Cell, 2017, 43(5): 618−629.

[41] Zhao T, Tang H, Xie L, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019, 71(9): 1353−1369.

（责任编辑　范　娟　李　契
责任编委　戴思兰）