DOI:10.11686/cyxb2025365 http://cyxb.magtech.com.cn
余冬雯, 王晓彤, 马永龙, 等. 2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿生理特性的影响. 草业学报, 2026, 35(9): 63－74.
YU Dong-wen, WANG Xiao-tong, MA Yong-long, *et al*. Effects of 2,4-epibrassinolide on the physiological characteristics of alfalfa under drought stress. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(9): 63－74.

2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿生理特性的影响

余冬雯[1],王晓彤[1],马永龙[1],吴轩[2],杨金辉[1],童玉花[1],李淑霞[1*]
(1. 宁夏大学林业与草业学院,宁夏 银川 750021;2. 中农立华生物科技股份有限公司,北京 100052)

摘要:随着全球气候变暖,干旱胁迫已成为制约作物生长和产量的主要环境因素。紫花苜蓿作为重要的牧草作物,其生长及生产性能在干旱条件下受到显著影响。2,4-表芸苔素内酯(EBR)是一种人工合成植物激素,可提高植物抗逆性,但其对紫花苜蓿抗旱性的影响及浓度效应尚不明确。本研究以紫花苜蓿'中苜1号'为材料,通过叶面喷施不同浓度EBR(0、0.02、0.03、0.05、0.10、0.20 mg·L^{-1}),结合干旱胁迫处理,探讨EBR对紫花苜蓿幼苗生长、光合色素含量、抗氧化酶活性及活性氧(ROS)代谢的影响。结果显示,干旱胁迫使紫花苜蓿株高、茎粗、叶面积、地上部鲜重和相对含水量分别下降36.7%、35.4%、43.6%、66.5%和40.7%,叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素和类胡萝卜素含量分别下降65.6%、73.4%、67.7%和78.0%,丙二醛(MDA)含量和相对电导率分别升高45.1%和65.5%,超氧阴离子(O_2^-·)产生速率和过氧化氢(H_2O_2)含量分别增加100.0%和79.4%,脯氨酸(Pro)含量增加931.8%。外源EBR处理,尤其是0.05 mg·L^{-1}浓度,显著缓解了干旱胁迫的不利影响:株高、茎粗、叶面积、地上部鲜重和相对含水量分别较干旱组提升31.3%、19.9%、62.6%、128.6%和47.5%;叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素及类胡萝卜素含量分别提升120.2%、183.8%、134.3%和221.6%;MDA含量和相对电导率分别降低28.8%和26.0%;O_2^-·产生速率和H_2O_2含量分别降低43.9%和41.9%;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)活性分别提高62.3%、74.6%、83.8%和150.5%;Pro含量则显著降低64.5%。高浓度EBR(0.20 mg·L^{-1})缓解效果减弱,表现出明显的浓度依赖性。综上,适宜浓度EBR(0.05 mg·L^{-1})可通过激活抗氧化防御系统以降低ROS积累和膜损伤,从而提高紫花苜蓿幼苗的耐旱性。本研究为EBR在紫花苜蓿抗旱生产中的应用提供了理论依据。

关键词:2,4-表芸苔素内酯;紫花苜蓿;干旱胁迫;抗氧化酶系统

Effects of 2, 4-epibrassinolide on the physiological characteristics of alfalfa under drought stress

YU Dong-wen[1], WANG Xiao-tong[1], MA Yong-long[1], WU Xuan[2], YANG Jin-hui[1], TONG Yu-hua[1], LI Shu-xia[1*]
1. *College of Forestry and Grassland Science, Ningxia University, Yinchuan* 750021, *China*; 2. *Sino-Agri Leading Biosciences Co., Ltd., Beijing* 100052, *China*

Abstract: With global climate warming, drought stress has become a major environmental factor restricting crop growth and yield. Alfalfa (*Medicago sativa*) is an important forage crop significantly impacted by drought, and shows reduced growth and yield under drought conditions. 2,4-epibrassinolide (EBR) is a synthetic plant hormone

收稿日期:2025-09-09;改回日期:2025-11-03
基金项目:宁夏重点研发项目(2023BSB03065)资助。
作者简介:余冬雯(2002－),女,福建三明人,在读硕士。E-mail: 1125730821@qq.com
*通信作者 Corresponding author. E-mail: lishuxia620@163.com

that can enhance the stress resistance of plants, but its effects on the drought tolerance of alfalfa and the concentration dependence of such effects remain unclear. In this study, seedlings of alfalfa 'Zhongmu No. 1' were treated with EBR (0, 0.02, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20 mg·L^{-1}) by foliar spraying and then subjected to a drought stress treatment. The effects of EBR on seedling growth, photosynthetic pigment content, antioxidant enzyme activities, and reactive oxygen species (ROS) metabolism under drought conditions were evaluated. The results show that the drought treatment negatively affected plant height, stem diameter, leaf area, aboveground fresh weight, and relative water content, with these parameters being 36.7%, 35.4%, 43.6%, 66.5%, and 40.7% lower, respectively, in the drought-treated plants than in the control plants. The contents of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids were 65.6%, 73.4%, 67.7%, and 78.0% lower, respectively, in the drought-treated plants than in the control plants. The malondialdehyde (MDA) content and relative electrical conductivity were 45.1% and 65.5% higher, respectively, in the drought-treated plants than in the control plants. The superoxide anion ($O_2^{-}\cdot$) production rate and hydrogen peroxide (H_2O_2) content were increased by 100.0% and 79.4%, respectively, and the proline (Pro) content was increased by 931.8% in the drought-treated plants compared with the control plants. Treatment with EBR, especially at 0.05 mg·L^{-1}, significantly alleviated the adverse effects of drought stress. Under drought stress, compared with the controls, the seedlings treated with EBR at 0.05 mg·L^{-1} showed increased plant height, stem diameter, leaf area, aboveground fresh weight, and relative water content (by 31.3%, 19.9%, 62.6%, 128.6%, and 47.5%, respectively); increased contents of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids (by 120.2%, 183.8%, 134.3%, and 221.6%, respectively); decreased MDA content and relative electrical conductivity (by 28.8% and 26.0%, respectively); decreased $O_2^{-}\cdot$ production rate and H_2O_2 content (by 43.9% and 41.9%, respectively), increased activities of superoxide dismutase, catalase, peroxidase, and ascorbate peroxidase (by 62.3%, 74.6%, 83.8%, and 150.5%, respectively); and a significant decrease of 64.5% in Pro content. The drought alleviation effect of EBR at the highest concentration (0.20 mg·L^{-1}) was lower than that at lower concentrations, showing a clear concentration dependence. In conclusion, treatment with EBR at a concentration (0.05 mg·L^{-1}) enhanced the drought tolerance of alfalfa seedlings by activating the antioxidant defense system to reduce ROS accumulation and ameliorate membrane damage. The findings of this study provide guidelines for the application of EBR in alfalfa production under drought conditions.

Key words: 2,4-epibrassinolide; alfalfa; drought stress; antioxidant enzyme system

全球变暖以每10年0.2 ℃的速度增长,预计在2030至2050年间,平均气温增幅可能达到1.5 ℃[1]。气候变暖引起蒸腾速率增加,进一步加剧了植物的干旱胁迫[2]。目前,全球约有1/3的土地面积受到干旱的影响,使干旱成为最主要的非生物胁迫之一,严重威胁植物的生长发育及产量稳定。水分缺乏会导致植物细胞膨压下降,抑制光合作用和气孔开放,进而影响碳同化与能量获取,造成生长停滞和生物量减少[3-4]。干旱还会引发一系列生理和分子层面的响应,包括渗透胁迫、细胞脱水、质膜及内体膜功能障碍、代谢途径受阻、能量供应不足以及叶绿体功能受损等[5]。此外,干旱诱导的活性氧(reactive oxygen species,ROS)积累会导致氧化胁迫,损伤细胞结构和生物大分子,加剧植物的生理紊乱[4-5]。在营养层面,水分短缺抑制根系对矿质元素的吸收和运输,造成营养失衡,影响植物的正常代谢与抗逆能力[3]。这些综合影响不仅降低了作物产量和品质,还威胁到农业生产和生态系统的稳定性。因此,提升作物耐旱性已成为保障粮食安全和生态可持续发展的紧迫任务。

芸苔素内酯(brassinolide,BR)是一种重要的天然类固醇激素,被称为第6种活性广谱植物生长激素[6]。2,4-表芸苔素内酯(2,4-epibrassinolide,EBR)是一种人工合成的高度活性的BR同系物,广泛用于各种试验研究和农业实践[7]。研究表明,BR可增强植物对非生物胁迫的耐受性,同时调节植物形态、生理和生化特性[8]。EBR处理能够显著改善干旱胁迫下大豆(*Glycine max*)的生理功能,包括提高蒸腾速率、光合作用效率和瞬时水分利用效率,使相对含水量和叶片水势的降幅收窄,并减少细胞膜的氧化损伤[9]。此外,EBR处理的大豆植株在干旱胁迫

后复水时表现出更好的恢复能力，株高和叶面积更大，败育粒数更少，干物质积累和产量显著增加[9]。EBR的应用还显著提高了烟草（*Nicotiana tabacum*）的抗氧化酶活性，包括超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化物酶（peroxidase，POD）以及过氧化氢酶（catalase，CAT），并上调了相关基因（*FeSOD*、*POD* 和 *CAT*）的表达，从而赋予植物更强的耐旱性[10]。

紫花苜蓿（*Medicago sativa*）以“牧草之王”著称，产草量高且草质优良，适口性好，易消化，并具有良好的固氮能力和生态适应性，因此被广泛种植[11]。干旱胁迫影响紫花苜蓿生长发育，降低其光合作用和水分利用效率[12]。在形态方面，干旱胁迫抑制紫花苜蓿的株高增长，主要是土壤水分不足导致根系吸水能力下降，限制了地上部分细胞的伸长与分裂[13]。干旱还降低了植物的生物量积累，这与气孔关闭引起的光合作用减弱及呼吸作用相对增强密切相关，导致有机物合成减少且消耗增加[14]。此外，干旱导致叶片变小、变厚，叶绿素含量下降及叶片脱落，进一步影响光合作用和生长发育[15]。在生理方面，干旱引发紫花苜蓿体内ROS[如超氧阴离子（superoxide anion，$O_2^{-}\cdot$）和过氧化氢（hydrogen peroxide，H_2O_2）]增加，抗氧化酶（SOD、CAT等）活性相应调整，清除过量ROS以减轻氧化损伤[16]。然而，当ROS积累超过清除能力时，细胞膜脂质过氧化及生物大分子损伤加剧，影响细胞功能[17]。同时，紫花苜蓿可通过积累脯氨酸（proline，Pro）、可溶性糖和甜菜碱等渗透调节物质，调控细胞渗透压，维持膨压和水分平衡，从而增强抗旱能力[18]。此外，干旱胁迫还会影响紫花苜蓿的营养品质，使其粗蛋白含量降低[12]。因此，探寻提高紫花苜蓿抗旱能力的有效策略并解析其适应机制至关重要。

现有研究表明，应用外源EBR是提高多种植物幼苗耐旱性的有效策略。然而，大多研究对外源EBR缓解干旱胁迫的浓度设置较为单一，缺乏对EBR浓度梯度的系统性比较，并且外源EBR参与调控紫花苜蓿抗旱性的研究还鲜有报道。因此，本研究主要探究不同浓度外源EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗生长、光合色素含量、抗氧化防御系统、脯氨酸积累的影响及其对干旱胁迫的缓解效应，旨在为紫花苜蓿抗旱性改良提供理论依据和技术支持。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验以紫花苜蓿品种‘中苜1号’为材料，2，4-表芸苔素内酯（EBR）购自四川润尔科技有限公司。

1.2　试验设计

本试验于2025年2月在宁夏大学牧草育种实验室开展。为确保试验材料的均一性，选取形态均匀且饱满的紫花苜蓿种子，先用75% 乙醇消毒1 min，随后用5% 次氯酸钠溶液消毒5 min，最后用蒸馏水冲洗4～5次以去除消毒剂残留。将消毒后的种子置于铺有湿润滤纸的培养皿中，放于光照培养箱中培养，培养条件设置为昼夜温度25 ℃/20 ℃、光周期12 h光照/12 h黑暗、相对湿度75%。待幼苗子叶完全展开并出现真叶后，选取生长一致的幼苗移栽至蛭石基质中，以Hoagland营养液浇灌。幼苗培养至30日龄时实施处理，试验设置7个处理组：对照组（CK）、干旱胁迫组（D）、干旱胁迫＋不同浓度（0、0.02、0.03、0.05、0.10、0.20 $mg\cdot L^{-1}$）EBR溶液的试验组（D＋$EBR_{0.02}$、D＋$EBR_{0.03}$、D＋$EBR_{0.05}$、D＋$EBR_{0.10}$和D＋$EBR_{0.20}$）。喷施处理时确保叶片正反面均匀润湿且无液滴下落，每48 h处理一次，连续处理两次后实施干旱胁迫。本试验设置了10 d的干旱胁迫周期（胁迫结束时土壤含水量为19%），参考了常用的牧草干旱胁迫周期[19-20]，能够有效模拟自然条件下中等强度且持续性的干旱环境，在诱导紫花苜蓿幼苗产生明显生理响应的同时保证植株存活率，从而确保后续指标测定的科学性和可比性。最终测定各项生理指标，所有处理均设3次生物学重复。

1.3　测定指标

用卷尺测量幼苗的株高（茎基至生长点），用国标游标卡尺测量茎粗（主茎），使用叶面积仪（AM350，中国上海）测量植株同一位置叶片面积。使用天平（LE204E/02，中国上海）称量地上部分的新鲜重量（aboveground fresh weight，AGB），随后将样品浸入蒸馏水中数小时至恒重，用滤纸吸干表面水分后称量，得到饱和鲜重（saturated fresh weight，SW），最后将样品置于105 ℃烘箱中杀青30 min，再转入65 ℃烘箱中烘干至恒重，称量得到干重（dry weight，DW）。根据公式：相对含水量（relative water content，RWC，%）＝[（FW－DW）/（SW－

DW)]×100计算。

叶绿素a(chlorophyll a,Chl a)、叶绿素b(chlorophyll b,Chl b)以及类胡萝卜素(carotenoid,Car)含量根据胡秉芬等[21]的方法进行提取。称取0.1 g新鲜紫花苜蓿叶片,溶于20 mL 95%乙醇中避光24 h,使用分光光度计(EPOCH,美国)测定665、649和470 nm处的吸光度值,以95%乙醇为空白对照。根据Arnon的修正公式计算叶绿素和类胡萝卜素的含量[22]。

相对电导率(relative electrical conductivity,REC)参照Zhao等[23]的方法,称取0.1 g的苜蓿叶片切碎,浸泡在装有30 mL去离子水的离心管中,并以150 r·min^{-1}振荡1 h。用电导率仪(DDS 307,中国上海)测量溶液的电导率为R_1;然后,将溶液煮沸15 min,冷却至室温,测量溶液的电导率为R_2。相对电导率计算公式为:REC(%)=(R_1/R_2)×100。

丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量、超氧阴离子(O_2^-·)产生速率、过氧化氢(H_2O_2)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase,APX)活性、脯氨酸(Pro)含量均采用相应的检测试剂盒(索莱宝科技有限公司,中国北京)测定。

1.4 统计分析

采用Microsoft Excel 2019进行数据统计和整理,采用SPSS 27.0进行单因素方差分析(one-way ANOVA,P<0.05)。多重比较采用Duncan法,结果以“平均值±标准误”表示,并使用GraphPad Prism 10.4.0和Origin 64进行绘图。

2 结果与分析

2.1 外源EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗生长的影响

干旱胁迫导致紫花苜蓿出现严重萎蔫,而喷施不同浓度EBR后该表型得到不同程度缓解(图1A)。与正常供水对照相比,干旱胁迫组紫花苜蓿幼苗的株高、茎粗、叶面积、地上部鲜重及相对含水量均显著降低(图1B~D和图2A,B)。外源EBR处理对上述干旱胁迫引起的生长抑制表现出浓度依赖性的缓解作用:在0.02~0.20 mg·L^{-1}浓度范围内,所有处理的株高均较干旱胁迫组有所提高,其中0.05 mg·L^{-1}处理效果最佳,增幅为31.3%,而更高浓度处理效果逐渐减弱;茎粗和叶面积在0.03~0.10 mg·L^{-1} EBR处理下均较干旱胁迫组显著增加,以0.05 mg·L^{-1}处理增幅最大,分别为19.9%和62.6%,0.02和0.20 mg·L^{-1}处理则无显著效果(P>0.05)。与干旱胁迫组相比,地上部鲜重仅在0.05 mg·L^{-1}处理下显著提升,增幅达128.6%;相对含水量在0.02~0.20 mg·L^{-1} EBR处理下均显著提升(P<0.05),以0.05 mg·L^{-1}处理增幅最高,为47.5%,0.10和0.03 mg·L^{-1}次之。综上,外源EBR能够有效缓解干旱胁迫对紫花苜蓿幼苗生长的抑制作用,其缓解效应呈先增强后减弱的趋势,最佳作用浓度为0.05 mg·L^{-1}。

2.2 外源EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片光合色素含量的影响

干旱胁迫显著降低了紫花苜蓿叶片的光合色素含量,与对照相比,叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素和类胡萝卜素含量分别下降65.6%、73.4%、67.7%和78.0%(图3A,B,D,E)。外源EBR处理(0.03~0.10 mg·L^{-1})均能显著缓解干旱对光合色素的抑制,且效果呈现浓度依赖性。其中0.05 mg·L^{-1}处理效果最为显著,使上述指标较干旱组分别提升120.2%、183.8%、134.3%和221.6%;0.03和0.10 mg·L^{-1}处理效果次之,分别使各指标提升至0.05 mg·L^{-1}处理组的70%~90%水平;0.02 mg·L^{-1}处理对叶绿素a无显著提升作用,对叶绿素b、总叶绿素和类胡萝卜素有显著提升作用,但效果弱于0.03~0.10 mg·L^{-1}处理;而0.20 mg·L^{-1}处理则对各项色素含量均未表现出显著改善作用(P>0.05)。在色素组成比例方面,叶绿素a/b与总叶绿素/类胡萝卜素变化趋势与色素含量相反:干旱处理组这两项比值均为最高;随着EBR浓度升高,两者均呈现先下降后上升的趋势,并在0.05 mg·L^{-1}时达到最低。尽管存在此趋势,但叶绿素a/b在各处理组间无显著差异;而总叶绿素/类胡萝卜素在干旱条件下显著高于对照,经各浓度EBR处理后,该比值显著降低至与对照无显著差异的水平(图3C,F)。这些结果表明外源EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿叶片光合色素具有浓度依赖性的保护作用,在0.05 mg·L^{-1}时效果最佳,同时能够促进色素组成比例恢复正常状态。

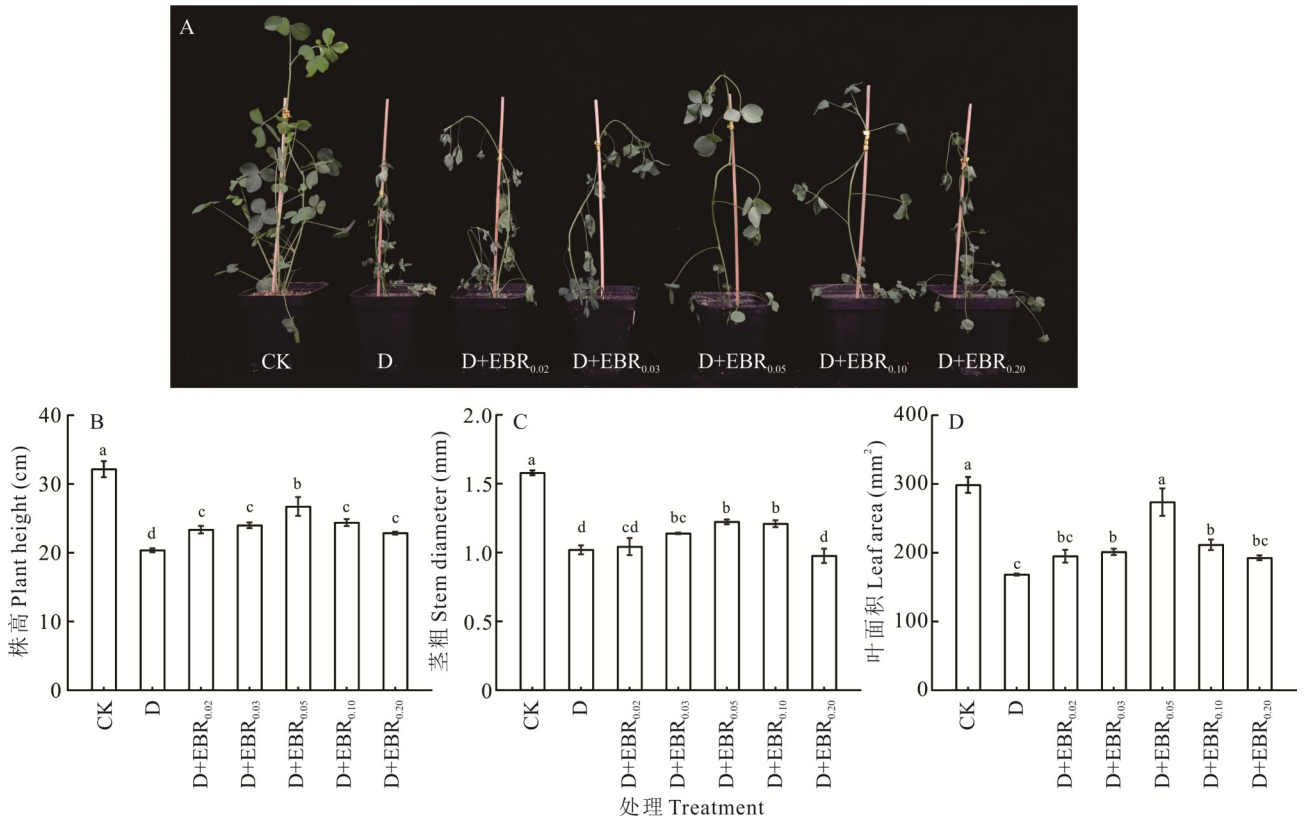


图 1　外源 2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗表型,株高,茎粗和叶面积的影响

Fig. 1　The effects of exogenous 2,4-epibrassinolide (EBR) on the phenotype, plant height, stem diameter and leaf area of alfalfa seedlings under drought stress

CK: 对照组 Control group; D: 干旱胁迫组 Drought stress group; D+EBR$_{0.02}$, D+EBR$_{0.03}$, D+EBR$_{0.05}$, D+EBR$_{0.10}$, D+EBR$_{0.20}$: 干旱胁迫+不同浓度 2,4-表芸苔素内酯溶液 Drought stress+different concentrations of 2,4-epibrassinolide solution (0.02, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20 mg·L^{-1}). 不同字母表示各处理在 $P<0.05$ 水平存在显著差异,相同字母代表无显著差异。下同。Different letters mean significant differences among treatments at $P<0.05$ level, and same letters mean no significant difference. The same below.

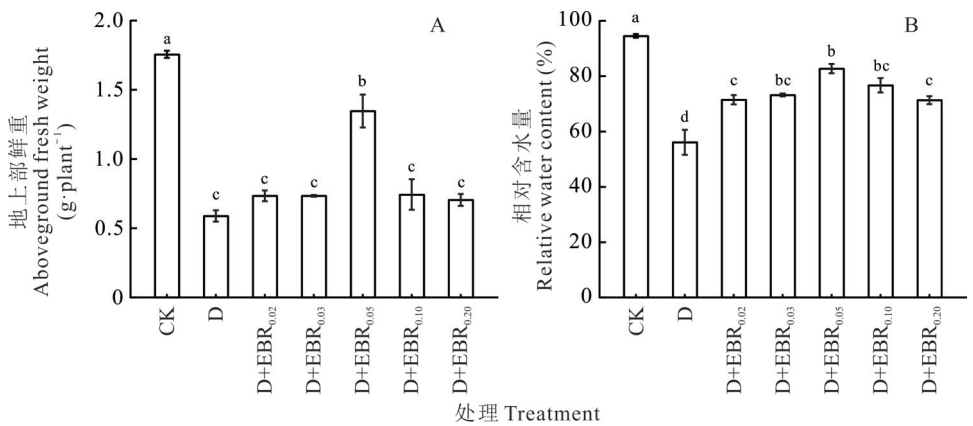


图 2　外源 2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗地上部鲜重和相对含水量的影响

Fig. 2　The effects of exogenous EBR on the aboveground fresh weight and relative water content of alfalfa seedlings under drought stress

2.3　外源 EBR 对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片 MDA 含量及相对电导率的影响

干旱胁迫下,紫花苜蓿幼苗叶片中的 MDA 含量和相对电导率较对照分别显著升高 45.1% 和 65.5%(图 4)。外源 EBR 处理显著缓解了上述膜损伤指标,表现为 MDA 含量和相对电导率在 0.03～0.10 mg·L^{-1} EBR 处理下均显著降低($P<0.05$)。具体而言,与干旱胁迫组相比,0.05 mg·L^{-1}外源 EBR 处理使两者分别降低 28.8% 和

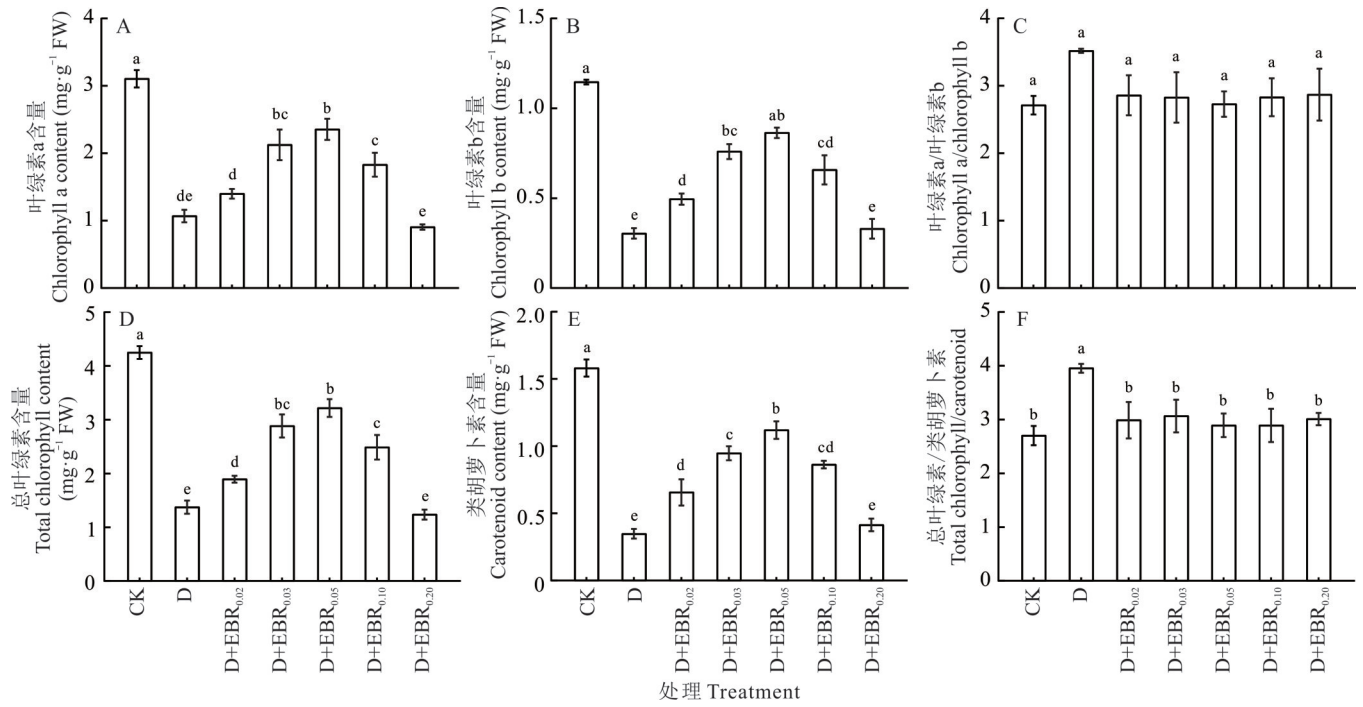


图3 外源2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片光合色素含量的影响

Fig. 3 The effects of exogenous EBR on photosynthetic pigment content in leaves of alfalfa seedlings under drought stress

FW: 新鲜重量 Fresh weight. 下同 The same below.

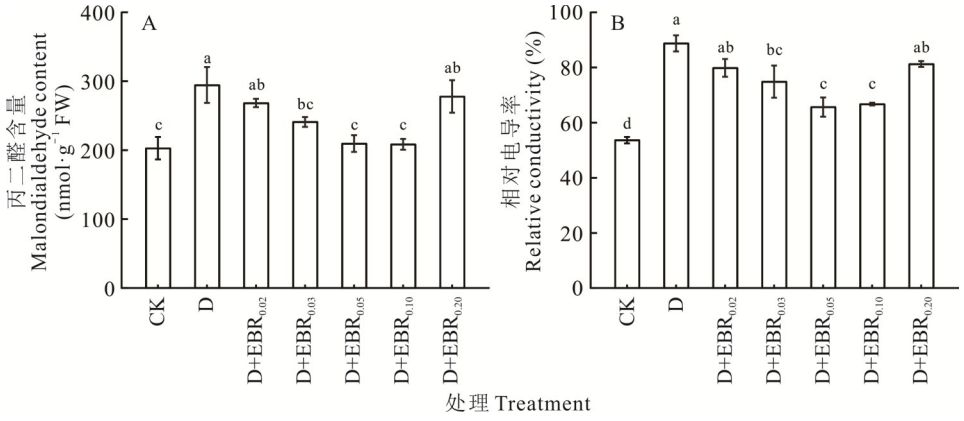


图4 外源2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片丙二醛含量和相对电导率的影响

Fig. 4 The effect of exogenous EBR on the malondialdehyde (MDA) content and relative conductivity in leaves of alfalfa seedlings under drought stress

26.0%;0.10 mg·L^{-1}处理分别降低29.2%和24.8%;0.03 mg·L^{-1}处理分别降低18.2%和15.6%;0.02与0.20 mg·L^{-1} EBR处理虽使两项指标呈现一定下降趋势(降幅为5%~10%),但未达显著水平。数据表明,适宜浓度(0.03~0.10 mg·L^{-1})的EBR能有效减轻干旱胁迫引起的膜脂过氧化与膜系统损伤,从而增强紫花苜蓿幼苗的耐旱性。

2.4 外源EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片ROS含量的影响

在干旱胁迫条件下,紫花苜蓿幼苗叶片中活性氧(ROS)积累显著增强,O_2^-·产生速率和H_2O_2含量较对照分别增加100.0%和79.4%(图5)。外源EBR处理显著缓解了ROS的过度积累:对于O_2^-·产生速率,较干旱胁迫处理,0.02~0.10 mg·L^{-1} EBR处理均表现出显著抑制作用($P<0.05$),其中0.05 mg·L^{-1}处理效果最佳(降低43.9%),0.10和0.03 mg·L^{-1}处理次之(分别降低42.7%和37.9%),而0.20 mg·L^{-1}处理则无显著效果;对于

H_2O_2 含量，较干旱胁迫处理，所有 EBR 处理浓度（0.02～0.20 mg·L^{-1}）均显著降低其积累水平，降幅依次为 36.3%（0.02 mg·L^{-1}）、39.4%（0.03 mg·L^{-1}）、41.9%（0.05 mg·L^{-1}）、37.4%（0.10 mg·L^{-1}）和 26.9%（0.20 mg·L^{-1}）。以上结果表明，外源 EBR 以剂量依赖的方式有效调节 ROS 代谢，其中 0.05 mg·L^{-1} 处理表现出最强的调控作用。

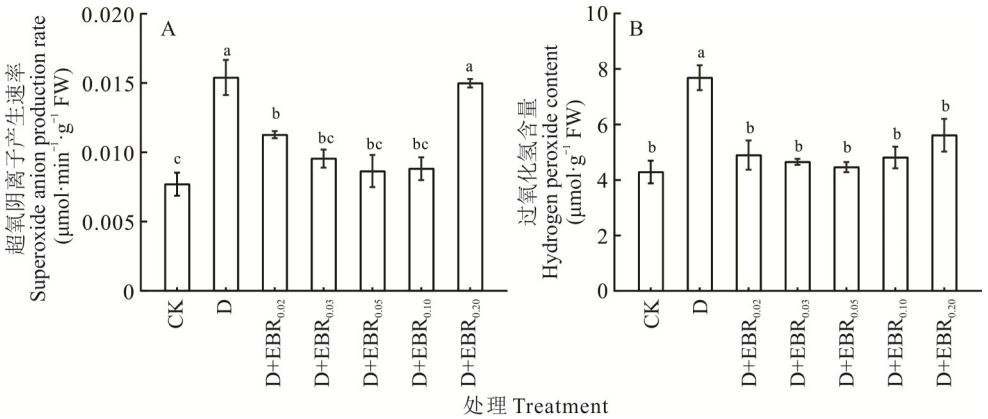


图 5　外源 2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片超氧阴离子产生速率和过氧化氢含量的影响

Fig. 5　The effects of exogenous EBR on superoxide anion production rate and hydrogen peroxide content in leaves of alfalfa seedlings under drought stress

2.5　外源 EBR 对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

在干旱胁迫条件下，紫花苜蓿幼苗叶片的抗氧化酶系统被显著激活，SOD、CAT、POD 和 APX 的活性较对照分别提高 81.7%、74.8%、46.6% 和 59.1%（图 6A～D）。外源 EBR 处理进一步增强了这 4 种酶的活性，其中 0.05 mg·L^{-1} 处理效果最为显著，使 SOD、CAT、POD 和 APX 活性较干旱胁迫组分别提高 62.3%、74.6%、83.8% 和 150.5%（$P<0.05$）；0.10 和 0.03 mg·L^{-1} 处理次之，各种酶活性增幅为 0.05 mg·L^{-1} 处理的 70%～

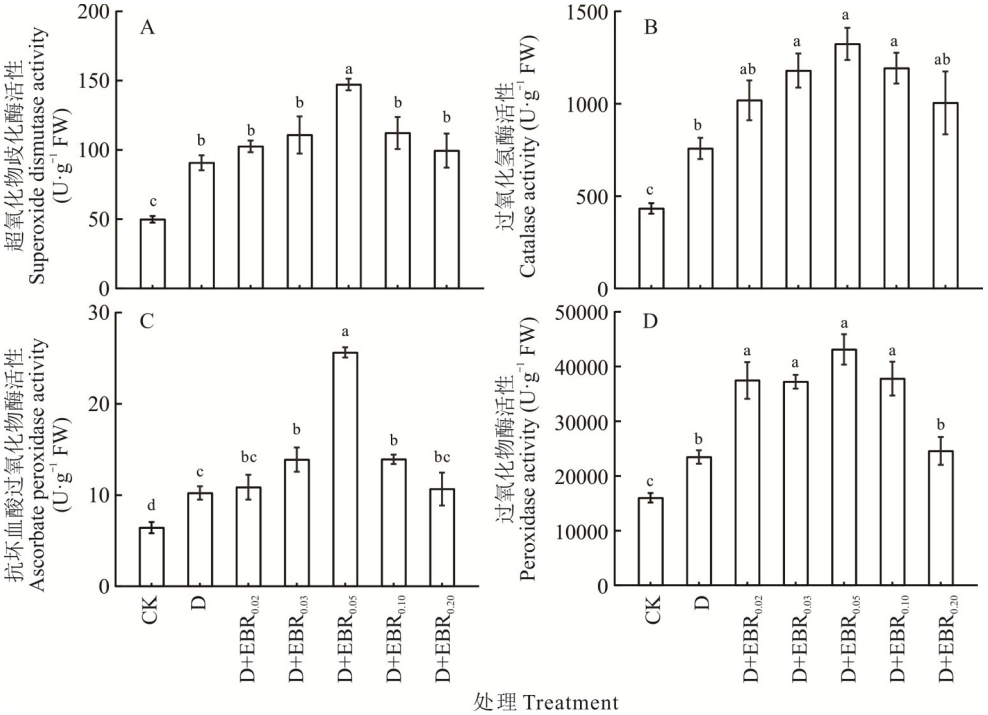


图 6　外源 2,4–表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

Fig. 6　The effects of exogenous EBR on the antioxidant enzyme activity in leaves of alfalfa seedlings under drought stress

90%；0.02 mg·L^{-1}处理仅显著提高POD活性(提高51.1%)，对其他3种酶活性无显著促进作用；0.20 mg·L^{-1}处理则未表现出明显的改善作用。上述结果表明，外源EBR以浓度依赖的方式调控抗氧化酶系统，其中0.05 mg·L^{-1}处理对4种抗氧化酶的激活作用最为显著，而过高浓度EBR(0.20 mg·L^{-1})的促进作用明显减弱，表明EBR可通过优化抗氧化酶活性来增强紫花苜蓿幼苗的干旱胁迫耐受性。

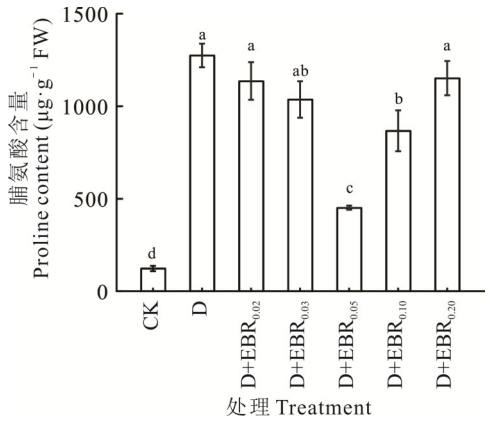


图7 外源2,4-表芸苔素内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片中脯氨酸含量的影响

Fig. 7 The effects of exogenous EBR on proline content in leaves of alfalfa seedlings under drought stress

2.6 外源EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿幼苗叶片脯氨酸含量的影响

干旱胁迫导致紫花苜蓿幼苗脯氨酸含量较对照显著积累(增幅达931.8%，图7)。外源EBR处理对干旱诱导的脯氨酸积累具有显著的调控作用：0.05和0.10 mg·L^{-1} EBR处理分别使脯氨酸含量较干旱胁迫组显著降低64.5%和37.2%($P<0.05$)；而其他浓度处理(0.02、0.03和0.20 mg·L^{-1})虽相比干旱胁迫组表现出降低趋势(降幅为10%～20%)，但未达显著差异水平($P>0.05$)。上述结果表明，0.10和0.05 mg·L^{-1} EBR能有效调控脯氨酸代谢，使其在干旱胁迫下维持正常水平，而其他浓度处理则未能显著改变脯氨酸的胁迫响应模式。

2.7 主要生理指标间的相关性分析

相关性分析结果显示，在干旱胁迫及外源EBR处理下，紫花苜蓿各主要生理指标间存在密切关联(图8)。具体表现为：生长指标株高(plant height，PH)和地上部鲜重(AGB)与多种抗氧化酶活性之间呈正相关，尤其是PH

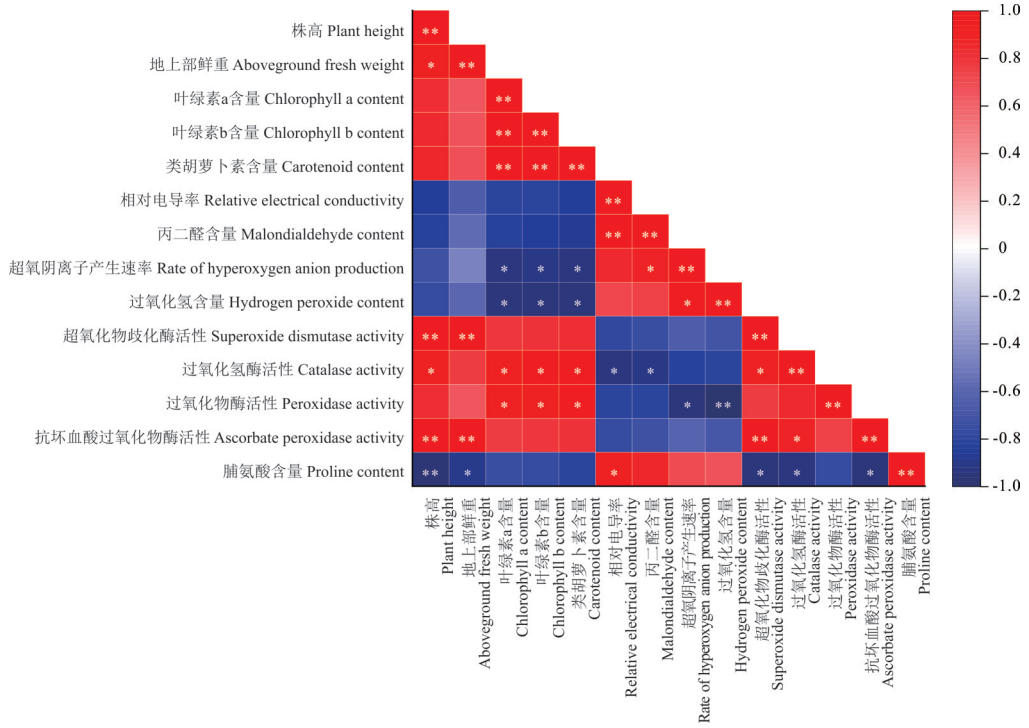


图8 主要生理指标间的相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis between the main physiological indexes

色块颜色从红色(正相关)到蓝色(负相关)，相关系数为－1～1。*和**分别表示相关性在$P\leqslant0.05$和$P\leqslant0.01$水平上显著。Color patches range from red (positive correlation) to blue (negative correlation) with correlation coefficients ranging from －1 to 1. * and ** indicate significant correlation at $P\leqslant0.05$ and $P\leqslant0.01$, respectively.

与SOD活性呈极显著正相关，但它们与膜损伤及活性氧指标（MDA、REC、O_2^{-}·、H_2O_2）多呈不显著负相关；光合色素含量（Chl a、Chl b、Car）与抗氧化酶活性及形态指标均呈正相关，且Chl a、Chl b和Car与CAT及POD活性显著正相关；活性氧（O_2^{-}·、H_2O_2）则与生长、色素、抗氧化酶活性均呈负相关，而与膜损伤及脯氨酸含量呈正相关；在抗氧化酶系统内部，SOD、CAT、POD和APX活性两两之间呈正相关，且SOD、APX和CAT三者间相关性显著；脯氨酸（Pro）与膜损伤及活性氧指标呈正相关，且与REC显著正相关，但与APX、SOD、CAT等抗氧化酶活性及部分生长指标呈显著负相关。

3　讨论

干旱胁迫通过诱导氧化应激、破坏细胞膜完整性及抑制光合作用等多种途径，严重制约植物的生长发育[4−5]。芸苔素内酯，特别是其高活性类似物EBR，已被证实能广泛增强植物对非生物胁迫的耐受性[7−9]。然而，其在紫花苜蓿抗旱中的作用机制尚未得到解析。本研究通过分析不同浓度EBR对干旱胁迫下紫花苜蓿生理特性的影响，旨在明确其缓解效应及作用机制。

3.1　EBR通过稳定光合色素与细胞膜维持光合能力与结构完整性

光合色素是植物光合作用的核心组分，其稳定性直接影响光能捕获与转化效率。在干旱胁迫下，植物体内ROS大量积累，攻击叶绿体膜系统，导致叶绿素降解酶（如叶绿素酶）活性上升，进而加速叶绿素a、b及类胡萝卜素的分解[24]。此外，干旱还会抑制叶绿素合成关键酶（如δ-氨基酮戊酸脱水酶和胆色素原脱氨酶）的活性，进一步降低光合色素含量[24]。类胡萝卜素不仅作为光合辅助色素，还在光保护中发挥关键作用，通过非光化学淬灭机制耗散过剩光能，防止光合系统Ⅱ（PSⅡ）受损[13]。因此，维持光合色素的稳定性，尤其是类胡萝卜素含量，对于干旱条件下光合机构的正常运转至关重要[13,16]。

本研究观察到干旱胁迫下紫花苜蓿叶片叶绿素a、b及类胡萝卜素含量急剧降低，证实了光合系统受损。EBR处理，特别是0.05 mg·L^{-1}，显著缓解了色素的降解。从机制层面看，EBR作为活性BR类似物，可被细胞膜受体BRI1/BAK1识别，通过失活负调控因子BIN2，激活核心转录因子BZR1/BES1。活化的BZR1/BES1可启动一系列保护性基因的表达，可能包括促进叶绿素合成及抑制其降解的基因，从而在转录水平上直接稳定光合色素[25]。此外，EBR处理还使干旱胁迫下异常升高的总叶绿素/类胡萝卜素恢复正常，说明其有助于优化光合系统的能量分配与光保护能力，这与抗氧化系统的增强共同保障了光合机构的正常功能。在细胞膜稳定性方面，EBR处理有效降低了干旱引发的MDA积累和膜透性增加。表明EBR参与促进膜脂合成或修复相关过程[26]，从而维持了细胞的区域化结构和功能，为生理代谢的正常进行提供了结构基础。

3.2　EBR通过增强抗氧化防御系统缓解干旱诱导的氧化损伤

植物在干旱胁迫下会产生活性氧（如O_2^{-}·和H_2O_2），若不能被及时清除，将引发膜脂过氧化、蛋白质变性和DNA损伤[27]。为应对氧化胁迫，植物进化出一套协同作用的抗氧化酶系统：SOD是首道防线，催化O_2^{-}·转化为H_2O_2；CAT和POD则负责将H_2O_2分解为H_2O和O_2；APX则通过抗坏血酸－谷胱甘肽循环在叶绿体和细胞质中清除H_2O_2[28]。这些酶的协同作用构成一个高效的ROS清除网络，维持细胞内氧化还原稳态，从而保护细胞结构免受氧化损伤[10,29]。

本研究结果表明，干旱胁迫能够引发紫花苜蓿典型的氧化应激模式，表现为O_2^{-}·产生速率、H_2O_2和MDA含量及相对电导率的显著上升。外源EBR处理，尤其是0.05 mg·L^{-1}浓度，能够剂量依赖性地逆转这一趋势，并显著激活上述4种关键抗氧化酶的活性。其深层机制在于，BR信号通路的核心转录因子BZR1/BES1被激活后，能够直接结合到多种抗氧化酶基因（如SOD，CAT，POD等）的启动子区域，正向调控它们的转录[25]。本研究观察到的酶活性协同增强现象，与在烟草和大豆中的研究发现相一致，表明EBR激活抗氧化防御是一种跨物种的保守机制[9−10]。相关性分析进一步显示SOD、CAT和APX活性间存在显著正相关关系，从统计学上支持了它们被EBR-BZR1/BES1信号模块协同调控的假设。因此，本研究推断，EBR很可能通过激活BZR1/BES1信号模块，在转录层面协调光合系统的保护和膜结构的稳定，为生理代谢的正常进行提供了基础。

3.3 EBR调控渗透平衡并促进紫花苜蓿的生长发育

Pro是植物体内重要的渗透调节物质。在长期轻度及中度干旱胁迫下,Pro会显著积累,从而降低渗透势,使植物具备较强的渗透调节能力,表现为低水势耐旱特性,在土壤缓慢干旱时,脯氨酸是较早增加的渗透调节物质之一[30]。除了渗透调节,Pro本身也具有一定的抗氧化功能。研究表明,脯氨酸能够作为抗氧化剂,直接清除过量的ROS(如H_2O_2和$O_2^-\cdot$),或间接激活植物体内的抗氧化剂,从而调节氧化还原反应。此外,脯氨酸还可以和酶相互作用,保护蛋白质的结构和功能,增加抗氧化酶的活力[31]。

本研究中,干旱胁迫导致脯氨酸含量急剧上升,这是植物应对水分短缺的典型生理响应。然而,最有效的EBR处理(0.05 mg·L^{-1})相比干旱胁迫处理显著降低了脯氨酸的积累。这一结果与部分研究中EBR在胁迫条件下进一步促进脯氨酸积累的报道不同[31],可能揭示了EBR作用的另一层面:由于EBR通过BZR1/BES1信号轴强力激活了经典的抗氧化酶系统,清除了绝大部分ROS,极大缓解了氧化胁迫的直接损伤,从而降低了对脯氨酸作为次级抗氧化剂和渗透保护剂的依赖[25]。从能量资源分配的角度看,脯氨酸的从头合成是一个高耗能过程。在EBR提供的更强有力的"抗氧化盾牌"下,植物可能通过BR信号优化了资源分配策略,将更多能量和碳骨架从脯氨酸合成转向直接的生长修复过程,这是一种更为经济的胁迫适应策略[32-33]。

上述生理层面的改善(光合系统受保护、氧化胁迫减轻、渗透平衡优化)共同转化为生长表型的恢复。EBR处理显著缓解了干旱对株高、茎粗、叶面积、生物量和相对含水量的抑制,且效果呈浓度依赖性,其中0.05 mg·L^{-1}效果最佳。这与EBR公认的促进细胞分裂与伸长、改善水分关系及提升资源利用效率的功能相符[6,9]。最终综合提升了紫花苜蓿在干旱条件下的生长表现和存活能力。此外,本研究中基于鲜重的测定结果,在干旱处理下可能因组织失水而被一定程度地高估,这是本试验方法的一个局限性。尽管如此,该方法仍然能真实反映植物在特定水分状态下的即时生理响应。

4 结论

本研究证实,适宜浓度(0.05 mg·L^{-1})的外源EBR可通过调节光合色素积累、抗氧化酶系统及渗透平衡等多重生理过程,以浓度依赖方式显著增强紫花苜蓿的抗旱性,为合理利用EBR增强紫花苜蓿耐旱性提供了理论依据和数据支持。

参考文献 References:

[1] Pishva Z K, Amini-Dehaghi M, Bostani A, *et al*. Biological and chemical nitrogen fertilizer impact on cumin (*Cuminum cyminum* L.) under different irrigation regimens. Journal of Herbmed Pharmacology, 2020, 9(3): 209-217.

[2] Yang S J, Vanderbeld B, Wan J X, *et al*. Narrowing down the targets: Towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. Molecular Plant, 2010, 3(3): 469-490.

[3] Nieves-Cordones M, García-Sánchez F, Pérez-Pérez J G, *et al*. Coping with water shortage: an update on the role of K^+, Cl^-, and water membrane transport mechanisms on drought resistance. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1619.

[4] Xu Z Z, Zhou G S, Shimizu H. Plant responses to drought and rewatering. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(6): 649-654.

[5] Haghpanah M, Hashemipetroudi S, Arzani A, *et al*. Drought tolerance in plants: physiological and molecular responses. Plants, 2024, 13(21): 2962.

[6] Sharma S K. Brassinosteroids application responses in fruit crops-a review. International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology, 2021, 14(2): 123-140.

[7] Li W J, Sun J, Zhang X Q, *et al*. The mechanisms underlying salt resistance mediated by exogenous application of 24-epibrassinolide in peanut. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6376.

[8] Kagale S, Divi U K, Krochko J E, *et al*. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. Planta, 2007, 225(2): 353-364.

[9] Silva A L J, Ferreira V M, Dos Santos C M, *et al*. 24-epibrassinolide promotes activation of physiological compensation mechanisms in response to drought stress and rehydration and improves yield in soybean. Journal of Agronomy and Crop Science, 2023, 209(3): 355-370.

[10] Khan R, Ma X H, Hussain Q, *et al*. Application of 2, 4-epibrassinolide improves drought tolerance in tobacco through

physiological and biochemical mechanisms. Biology, 2022, 11(8): 1192.

[11] Zhang Y Y, Wang L. Advances in basic biology of alfalfa (*Medicago sativa* L.): a comprehensive overview. Horticulture Research, 2025, 12(7): uhaf081.

[12] Han R H, Lu X S, Gao G J, *et al*. Photosynthetic physiological response of alfalfa (*Medicago sativa*) to drought stress. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(12): 5229-5237.
韩瑞宏, 卢欣石, 高桂娟, 等. 紫花苜蓿(*Medicago sativa*)对干旱胁迫的光合生理响应. 生态学报, 2007, 27(12): 5229-5237.

[13] Wang X M, Mace E, Tao Y F, *et al*. Large-scale genome-wide association study reveals that drought-induced lodging in grain sorghum is associated with plant height and traits linked to carbon remobilisation. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133: 3201-3215.

[14] Cui Y, Ning S W, Jin J L, *et al*. Quantitative lasting effects of drought stress at a growth stage on soybean evapotranspiration and aboveground biomass. Water, 2020, 13(1): 18.

[15] Liu J, Huang J, Xiong P D. Rewatering after drought: Unravelling the drought thresholds and function recovery-limiting factors in maize leaves. Plant, Cell & Environment, 2024, 47(12): 5457-5469.

[16] Fei X T, Li J M, Kong L J, *et al*. miRNAs and their target genes regulate the antioxidant system of *Zanthoxylum bungeanum* under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 150(2): 196-203.

[17] Antoniou C, Fragkoudi I, Martinou A, *et al*. Spatial response of *Medicago truncatula* plants to drought and spider mite attack. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 130: 658-662.

[18] Hussan S, Rather M A, Dar Z A, *et al*. Decoding the enigma of drought stress tolerance mechanisms in plants and its application in crop improvement//Innovative approaches for sustainable development: Theories and practices in agriculture. Cham: Springer International Publishing, 2022: 339-368.

[19] Zhang C M, Shi S L. Physiological and proteomic responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties to PEG-induced osmotic stress. Frontiers in Plant Science, 2018, 9(1): 242.

[20] Zhou Y L, You X Y, Wang X Y, *et al*. Exogenous 24-epibrassinolide enhanced drought tolerance and promoted BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 expression of quinoa. Plants, 2024, 13(6): 873.

[21] Hu B F, Huang H L, Ji Y Z, *et al*. Evaluation of the optimum concentration of chlorophyll extract for determination of chlorophyll content by spectrophotometry. Pratacultural Science, 2018, 35(8): 1965-1974.
胡秉芬, 黄华梨, 季元祖, 等. 分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度. 草业科学, 2018, 35(8): 1965-1974.

[22] Zhang Q D. Several methods for the determination of chlorophyll. Chinese Bulletin of Botany, 1985, 3(5): 60-64.
张其德. 测定叶绿素的几种方法. 植物学通报, 1985, 3(5): 60-64.

[23] Zhao D Y, Shen L, Fan B, *et al*. Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. Journal of Food Science, 2009, 74(5): C348-C352.

[24] Lv A M, Su L T, Fan N N, *et al*. The MsDHN1-MsPIP2;1-MsmMYB module orchestrates the trade-off between growth and survival of alfalfa in response to drought stress. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22(5): 1132-1145.

[25] Lv M H, Li J. Molecular mechanisms of brassinosteroid-mediated responses to changing environments in *Arabidopsis*. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(8): 2737.

[26] Kou J T. Physiological mechanism of 24-epibrassinolide-regulated salt stress tolerance in *Medicago sativa*. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
寇江涛. 2,4-表油菜素内酯诱导下紫花苜蓿耐盐性生理响应研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[27] Jomova K, Alomar S Y, Alwasel S H, *et al*. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: Antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. Archives of Toxicology, 2024, 98(5): 1323-1367.

[28] Yu W Z, Luo L, Qi X Y, *et al*. Insights into the impact of trans-zeatin overproduction-engineered *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa (*Medicago sativa* L.) tolerance to drought stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(15): 8650-8663.

[29] Zandi P, Schnug E. Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. Biology, 2022, 11(2): 155.

[30] Ma X R, Liang Q W, Han Y S, *et al*. Integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic analyses revealing the roles of amino acid and sucrose metabolism in augmenting drought tolerance in *Agropyron mongolicum*. Frontiers in Plant Science,

2024, 15: 1515944.

[31] Che Y M, Hou L X, Sun Y J, *et al*. Hydrogen sulfide functions in regulation of stomatal movement and stress response in plant. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(10): 18-26.
车永梅, 侯丽霞, 孙艳君, 等. H_2S参与植物气孔运动调节与逆境响应过程研究进展. 生物技术通报, 2016, 32(10): 18-26.

[32] Zhao B Q, Liu Q Y, Wang B S, *et al*. Roles of phytohormones and their signaling pathways in leaf development and stress responses. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3566-3584.

[33] Xia X J, Dong H, Yin Y L, *et al*. Brassinosteroid signaling integrates multiple pathways to release apical dominance in tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(11): e2004384118.