

盐胁迫诱导木豆幼苗形态、生理及黄酮代谢的多层次响应特征

姚耀源¹ 杨杰¹ 张悦新¹ 付玉杰^{1,2,3,4*}

(1. 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083; 3. 国家林业和草原局黑龙江三江平原沼泽草甸生态系统国家定位观测研究站, 双鸭山 155100; 4. 北京市植物次生代谢物高效合成重点实验室, 北京 100083)

摘要 为系统阐明不同浓度盐胁迫条件下木豆(*Cajanus cajan*)幼苗的生长响应特征及其抗氧化酶活性与黄酮类代谢物积累的动态变化规律, 采用生长一致的木豆幼苗作为材料, 设置0、50、100、150、200 mmol·L⁻¹ NaCl处理, 在处理1、3、5、7 d进行表型观察及根系扫描分析, 测定根长、表面积、投影面积、体积及平均直径等根系形态指标, 同时测定超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性, 并在150 mmol·L⁻¹ NaCl处理条件下选取不同时间点样品, 利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术对黄酮类代谢物进行定性与定量分析, 并结合相关基因表达变化进行分析。结果表明: 盐胁迫对木豆幼苗生长具有显著的浓度依赖性抑制作用。随着盐浓度升高及处理时间延长, 幼苗表现为主根伸长受阻、侧根发育受限及地上部生长减缓, 且在处理3 d后抑制效应明显增强。根系形态指标整体随时间呈增长趋势, 但在100 mmol·L⁻¹及更高盐浓度处理下增长幅度明显降低, 50 mmol·L⁻¹处理在部分观测时期对根系生长表现出一定促进作用; 根系平均直径变化幅度较小, 但在中高盐浓度条件下略有增加。SOD活性在中等盐浓度下显著升高并趋于稳定, POD活性随盐浓度增加及处理时间延长持续上升。在150 mmol·L⁻¹ NaCl处理条件下, 根系黄酮类代谢物呈现阶段性积累特征, 木豆芪酸质量浓度整体呈上升趋势, 异牡荆素质量浓度波动变化明显, 染料木苷质量浓度呈诱导积累趋势, 染料木素质量浓度在处理后期显著增加。基因表达分析结果显示, *CcPAL2*、*CcACL4*及*CcCHS3*表达量降低, *CcC4H1*表达显著上调, *CcCHI2*与*CcIFS1*表达量升高。研究表明, 盐胁迫条件下, 木豆幼苗生长受到抑制并表现出明显的时间与浓度效应, 抗氧化酶活性及黄酮类代谢物含量随胁迫过程呈动态变化, 黄酮生物合成通路关键基因表达存在差异性调控。

关键词 木豆; 盐胁迫; 根系形态构型; 黄酮类次生代谢产物

中图分类号: Q945 文献标志码: A doi: 10. 7525/j. issn. 1673-5102. 2026. 04. 013

Morpho-Physiological and Metabolic Responses and Expression Profiling of the CcTCP Gene Family in Pigeon Pea under Salt Stress

YAO Yaoyuan¹ YANG Jie¹ ZHANG Yuexin¹ FU Yujie^{1,2,3,4*}

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Beijing Forestry University, Beijing 100083; 3. Ecological Observation and Research Station of Heilongjiang Sanjiang Plain Wetlands, National Forestry and Grassland Administration, Shuangyashan 155100; 4. Beijing Key Laboratory of Efficient Synthesis of Plant Secondary Metabolites, Beijing 100083)

Abstract To systematically elucidate the growth response characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) seedlings under different concentrations of salt stress and the dynamic changes in antioxidant enzyme activities and flavonoid metabolite accumulation, uniformly grown pigeon pea seedlings were used as plant materials. The seedlings were treated with 0, 50, 100, 150, and 200 mmol·L⁻¹ NaCl solution. Phenotypic observation and root scanning analysis were conducted at 1, 3, 5, and 7 days after treatment. Root morphological parameters, including root length, surface area, projected area, volume, and average diameter, were measured. Meanwhile, the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) were determined. In addition, samples collected under 150 mmol·L⁻¹ NaCl treatment at different time points were analyzed using UPLC-MS/MS

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD2200602)。

第一作者简介: 姚耀源(2001—), 女, 硕士研究生, 主要从事林木分子生物学研究。

* 通信作者: E-mail: yujie_fu@163.com。

收稿日期: 2026年4月26日。

for qualitative and quantitative profiling of flavonoid metabolites, combined with analysis of related gene expression changes. Results showed that salt stress significantly inhibited the growth of pigeon pea seedlings in a concentration-dependent manner. With increasing salt concentration and prolonged treatment duration, seedlings exhibited inhibited primary root elongation, restricted lateral root development, and reduced shoot growth, with the inhibitory effect becoming more pronounced after 3 days of treatment. Root morphological parameters generally increased over time; however, the magnitude of increase was significantly reduced under $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and higher NaCl treatments, whereas $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl showed a promoting effect on root growth at certain time points. The average root diameter showed relatively small variation under $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl treatment but slight increase under moderate to high salt conditions. SOD activity increased significantly under moderate salt concentration and then stabilized, while POD activity continuously increased with increasing salt concentration and treatment duration. Under $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl treatment, flavonoid metabolites in roots exhibited stage-dependent accumulation patterns. Root stilbene acid mass concentration showed an overall increasing trend, isovitexin mass concentration fluctuated markedly, genistin displayed induced accumulation, and genistein mass concentration significantly increased at later stages of treatment. Gene expression analysis showed that the expression levels of *CcPAL2*, *Cc4CL4*, and *CcCHS3* were downregulated, while *CcC4H1* was significantly upregulated, and *CcCHI2* and *CcIFS1* were also induced. In conclusion, salt stress inhibited the growth of pigeon pea seedlings and showed clear time- and concentration-dependent effects. Antioxidant enzyme activities and flavonoid metabolite levels dynamically changed during the stress process, and the key genes in the flavonoid biosynthesis pathway exhibited differential regulation under salt stress conditions.

Key words pigeon pea; salt stress; root system architecture; flavonoid secondary metabolites

盐胁迫是制约农业生产的重要因素^[1]。据统计,当前全球约有 130.81 亿 hm^2 土地,其中 $10\% \sim 20\%$ 的灌溉农田存在不同程度的盐害问题,并且盐渍化面积仍呈持续扩大趋势^[2]。高盐环境导致 Na^+ 和 Cl^- 等在植物体内过量积累,进而引发离子毒害、营养失衡及氧化损伤等一系列生理障碍^[3]。盐胁迫通常伴随着活性氧(reactive oxygen species, ROS)的大量积累,包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)及羟基自由基($\cdot\text{OH}$)等^[4]。过量 ROS 会引发脂质过氧化、蛋白质氧化和核酸损伤,破坏细胞膜完整性和细胞代谢稳态,最终影响植物正常生长甚至导致细胞死亡^[5]。尽管植物能够通过超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及过氧化物酶(POD)等抗氧化系统清除部分 ROS^[6],但在长期或高强度盐胁迫条件下,其清除能力往往不足以维持细胞氧化还原平衡。

根系是植物最早感知土壤盐分变化的重要器官,也是植物适应盐胁迫的第一道屏障。盐胁迫通常显著抑制主根和侧根伸长,降低根系表面积、根体积及根毛数量,从而削弱植物对水分和矿质元素的吸收能力。与此同时,地上部常表现为叶片失绿、早衰及光合作用效率下降等症状,最终导致植株生物量与产量降低^[7]。因此,根系形态构型的变化能够较为直观地反映植物对盐环境的适应能力,是评价植物耐盐性的重要指标之一。

植物次生代谢产物(secondary metabolites)在植物逆境适应过程中发挥重要作用,其中黄酮类化合物(flavonoids)被认为是植物响应盐胁迫的关键次生代谢产物之一。盐胁迫诱导的 ROS 积累能够激活苯丙烷代谢途径及黄酮生物合成通路,从而促进黄酮类物质在植物体内积累^[8]。在这一过程中,苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)及查尔酮异构酶(CHI)等关键基因受到显著调控,共同推动黄酮及其衍生物的合成^[9]。黄酮类化合物具有较强的自由基清除能力,能够有效缓解盐胁迫诱导的氧化损伤,维持细胞膜稳定性并保护蛋白质和核酸结构^[10]。在豆科(Fabaceae)植物中,异黄酮类化合物对盐胁迫的响应尤为显著,其不仅参与抗氧化防御,还可能作为信号分子介导逆境响应与根系生理调控,增强植株整体耐盐能力。黄酮代谢的增强并非被动积累,而是受到多种转录因子和激素信号的精细调控,使盐胁迫信号感知与代谢重编程紧密耦联,从而构成植物适应盐渍环境的重要分子基础^[11]。

木豆(*Cajanus cajan*)是一种重要的粮食、饲料兼用豆类作物,广泛分布于热带和亚热带地区,具有较强的抗旱、耐贫瘠及一定的耐盐能力,其根系发达且具有较强的固氮能力,因此在边际土地利用及生态农业中具有重要价值^[12]。此外,木豆富

含多种黄酮及异黄酮类次生代谢物,如染料木素(genistein)、染料木苷(genistin)和大豆苷元(daidzein)等,这些代谢物在植物抗氧化防御及逆境响应中发挥重要作用。

近年来,随着高通量测序技术的快速发展,关于木豆逆境响应分子机制的研究逐渐增多。蛋白组和转录组联合分析表明,木豆耐盐性与离子区隔化、抗氧化防御、能量代谢调节及MAPK信号通路激活密切相关,耐盐型基因型能够通过增强ROS清除能力和维持 Na^+/K^+ 稳态,提高植物对盐胁迫的适应能力^[13]。转录组分析发现,茉莉酸甲酯(MeJA)处理能够显著诱导木豆苯丙烷代谢及黄酮生物合成途径相关基因的表达,并促进染料木素、芹菜素(apigenin)等黄酮类代谢物积累,其中转录因子CcbHLH35在MeJA响应及黄酮生物合成调控过程中发挥重要作用,表明黄酮代谢重编程与木豆逆境适应密切相关^[14]。此外,TCP、MYB、WRKY和NAC等多种转录因子家族也被报道参与木豆逆境响应调控,它们可能通过调节相关代谢途径和信号网络,提高植株对逆境环境的适应能力^[15]。对*CcCIPK14*过表达木豆的转录组分析表明,*CcCIPK14*能够显著促进染料木苷、染料木素及芹菜素等黄酮类物质积累,并增强木豆抗逆能力;而抑制黄酮生物合成关键基因*CcIF7GT*后,转基因植株黄酮含量及抗逆能力均明显下降,说明黄酮积累是提高木豆逆境耐受性的重要原因之一^[16]。

土壤盐渍化是制约农业生产的重要非生物胁迫因子之一,严重影响植物的生长发育与产量形成。木豆作为一种重要的豆科作物,具有较强的耐逆潜力,但其对盐胁迫的响应机制,尤其是根系生长与代谢物积累的动态变化规律,尚缺乏系统研究。根系作为植物感知和响应土壤盐分的第一道屏障,其形态构型的改变直接反映植物对盐胁迫的适应策略;同时,根系中积累的黄酮类等次生代谢物在活性氧清除和信号调控中发挥关键作用。因此,阐明盐胁迫下木豆根系生长特性与代谢物积累的协同变化,对于揭示木豆耐盐机制具有重要意义。本研究以木豆幼苗为材料,系统探究不同浓度NaCl处理下根系生长参数的动态变化,明确盐胁迫对根系构型的浓度依赖性与时间效应。同时,分析抗氧化酶活性的响应特征,评估其协同清除活性氧的能力。进一步以 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

NaCl为胁迫条件,检测根系中木豆芪酸(cajanin-stibene acid)、异牡荆素(isovitexin)、染料木苷及染料木素等黄酮类代谢物含量变化,揭示代谢物在盐胁迫不同阶段的积累规律。最后对黄酮通路关键结构基因进行表达分析,进一步探究基因响应盐胁迫的表达趋势。通过整合表型、生理、代谢与分子数据,旨在为木豆耐盐机制的深入解析提供理论依据,并为耐盐种质筛选与栽培管理提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料与盐胁迫处理

木豆种子用初始温度 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的无菌水浸泡5 min,沥干后置于育苗盘上萌发3 d,幼苗长出后移栽至蛭石与营养土(体积比1:1)的营养基质中,于光照培养箱中进行培养,光照周期为16 h光照/8 h黑暗,温度 $(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度约60%。当幼苗生长至2片真叶完全展开且长势一致时进行盐胁迫处理。设置5个盐胁迫梯度,分别为0、50、100、150、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl溶液,分别在处理后1、3、5、7 d观察木豆表型并使用根系扫描仪(Epson Expression 10000XL,美国)扫描木豆根系。

1.2 木豆根系形态指标测定

采用WinRHIZO软件对植物根系形态进行扫描与定量分析。将植株取出后用流水轻柔冲洗根系,去除附着的土壤或培养基,避免损伤细根;随后将根系置于盛有去离子水的透明扫描盘中,并充分展开,使根系均匀分布且避免重叠。将样品置于平板扫描仪上,在统一参数(400~600 dpi,灰度或彩色模式)下扫描获取根系图像,并保存为TIFF格式。将图像导入WinRHIZO软件后,调整阈值及相关参数(如最小根径与像素校准)以区分根系与背景,随后自动提取总根长、投影面积、表面积、平均根径及根体积等指标,必要时进行人工校正。每个处理设置3个生物学重复,结果取平均值并计算标准误。分析完成后采集木豆组织样品,迅速置于液氮中速冻,并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,用于后续检测抗氧化酶活性和黄酮积累量。每个处理设有3个生物学重复和3个技术重复。

1.3 抗氧化酶活性的测定

取0.2 g木豆样品洗净后置于预冷的研钵中,加入1.6 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预冷的磷酸缓冲液($\text{pH}=7.8$)在冰浴上研磨成匀浆,转入离心管中在

4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心 20 min,上清液即为酶液。

SOD 活性采用氮蓝四唑(nitro blue tetrazolium, NBT)光化还原法^[17]测定。测定时以暗处理空白调零,在避光条件下测定 560 nm 处吸光度。SOD 活性以抑制 NBT 光化还原 50% 所需酶量定义为一个活性单位(U)。SOD 活性按公式 1 计算(式中记为 A_{SOD}),并以 $U \cdot g^{-1}$ 表示:

$$A_{SOD} = [(A_{CK} - A_E) \times V] \div \left(\frac{1}{2} A_{CK} \times m \times V_{il} \right) \quad (1)$$

式中: A_{CK} 为光照对照吸光度; A_E 为样品吸光度; V 为样品总体积(mL); V_{il} 为参与反应的酶液体积(mL); m 为样品鲜质量(g)。

POD 活性采用愈创木酚法测定。测定时,在 3 mL 反应体系中加入 30 μL 酶液,以 PBS 为空白对照调零,记录 470 nm 处 1 min 内吸光度变化值。POD 活性(式中记为 A_{POD})以每分钟吸光度增加 0.01 定义为一个酶活单位(U),并按公式 2 计算:

$$A_{POD} = (\Delta A_{470} \times V_{i2}) \div (m \times V_s \times 0.01 \times t) \quad (2)$$

式中: ΔA_{470} 为单位时间内吸光度变化值; m 为样品鲜质量(g); t 为反应时间(min); V_{i2} 为样品总体积(mL); V_s 为反应中加入的酶液体积(mL)。结果以 $U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 表示。

1.4 黄酮类代谢物 UPLC-MS/MS 定量分析

选取经 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 0、1、3、5、7 d 的木豆植株样品 1 g,液氮速冻研磨后,加入 50 mL 70% 乙醇,50 ℃超声 1 h,然后 4 ℃、10 000 r·min⁻¹离心 10 min 后取上清液通过 0.22 μm 有机滤膜过滤用于进样,滤液置于 4 ℃保存。采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)系统进行黄酮含量检测。检测在正负离子模式下进行,利用多反应监测(MRM)模式进行定性与定量^[18]。色谱分离使用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液;B 为乙腈。梯度洗脱条件如下:0~2 min, 10% B;2~

10 min, 10%~40% B; 10~15 min, 40%~70% B; 15~17 min, 70%~95% B; 17~19 min, 95% B; 19~22 min, 10% B,以平衡系统;流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 2 μL。质谱检测采用负离子电喷雾电离(ESI⁻),离子源参数设置为:喷雾电压 2.5 kV,毛细管温度 320 ℃,辅助气体流速 10 arb,鞘气体流速 35 arb。各黄酮单体依据纯品确定多反应监测转换,并使用外标法建立标准曲线。准确称取标准品,用甲醇配制成 1 g·L⁻¹ 的储备液,并逐级稀释为不同浓度梯度(0.01~10.00 μg·mL⁻¹)的标准溶液。将各质量浓度标准溶液依次进行 UPLC-MS/MS 检测,记录其峰面积。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归分析,建立标准曲线方程,并计算决定系数(R^2)。所有样品均进行至少 3 个生物学重复与 3 个技术重复。

1.5 黄酮途径关键酶基因 qRT-PCR 分析

选取经 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 0 和 7 d 的木豆植株样品 0.1 g,使用植物 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA 并反转录成 cDNA。使用荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对黄酮途径关键酶基因进行定量分析,以验证基因表达水平。为避免重复分析并降低试验冗余,本研究在每个基因家族中选择 1 个具有典型序列特征且在转录组中表达较为稳定的成员作为代表基因,用于 qRT-PCR 表达验证分析。荧光定量 PCR 的特异性引物序列详见表 1。木豆肌动蛋白基因(*CcActin*)(登录号 XM_020358530.2)被选作内参基因,用于校正表达量差异,目的基因的相对表达量通过 2^{×SuperStar Universal SYBR Master Mix} 荧光染料法测定。每个样品设 3 个技术重复,并进行 3 个独立生物学重复。基因相对表达量根据 2^{-ΔΔCt} 方法^[19]计算。使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据统计分析,显著性差异通过单因素方差分析(ANOVA)检验。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers for qRT-PCR

基因名称 Gene name	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')
<i>qCcActin</i>	AAGCTCAGTCCAAGAGAGGT	ACATGGCGGGGTATTGAAG
<i>qCcPAL2</i>	TGAACAACGGGACCGACAGT	AAAACCTGATGAGTTCTTCTGC
<i>qCc4CL4</i>	GCTGACGCACAAGAGTCTGATG	CAGCAACGCCCTAATCTCAA
<i>qCcC4H1</i>	CCTATGGTCCCGTTTTCCTACT	TGAGTGAGGACATGTGTGGC
<i>qCcCHS3</i>	ACGCCAGGCAGGACATAGTA	ACTTTGGTTGACCCCATTC
<i>qCcCHI2</i>	CCTCCGCCAAGACCTATTTC	CGAGTGATTGGATGGCTTGA
<i>qCcIFS1</i>	AGCCCTTCGCCACCTACCTAA	GGAATAGTGAGAAGGGGTTT

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下木豆表型变化

采用 0、50、100、150、200 mmol·L⁻¹ NaCl 分别处理木豆幼苗 1、3、5、7 d,植株表型如图 1 所示,整体来看,随着盐浓度的升高及处理时间的延长,木豆幼苗的生长逐渐受到抑制,表现出明显的剂量效应和时间效应。在对照处理下,幼苗生长正常,主根伸长明显,侧根发育良好,地上部叶片展开正常。50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理对幼苗生长影响较小,在处理初期(1~3 d)与对照差异不明显,但在 5~7 d

可观察到主根伸长略有减缓,侧根数量有所减少。随着盐浓度升高至 100 mmol·L⁻¹,幼苗生长开始受到明显抑制,表现为主根长度缩短、侧根发育受限,部分幼苗出现轻微弯曲现象。150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下抑制作用进一步加剧,幼苗主根明显变短,根系弯曲程度增加,侧根数量显著减少,部分植株地上部生长受阻。200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理对木豆幼苗生长抑制最为显著,随着处理时间延长,幼苗根系发育严重受限,主根伸长明显受阻,侧根几乎不发育,部分植株出现生长停滞甚至萎蔫现象。

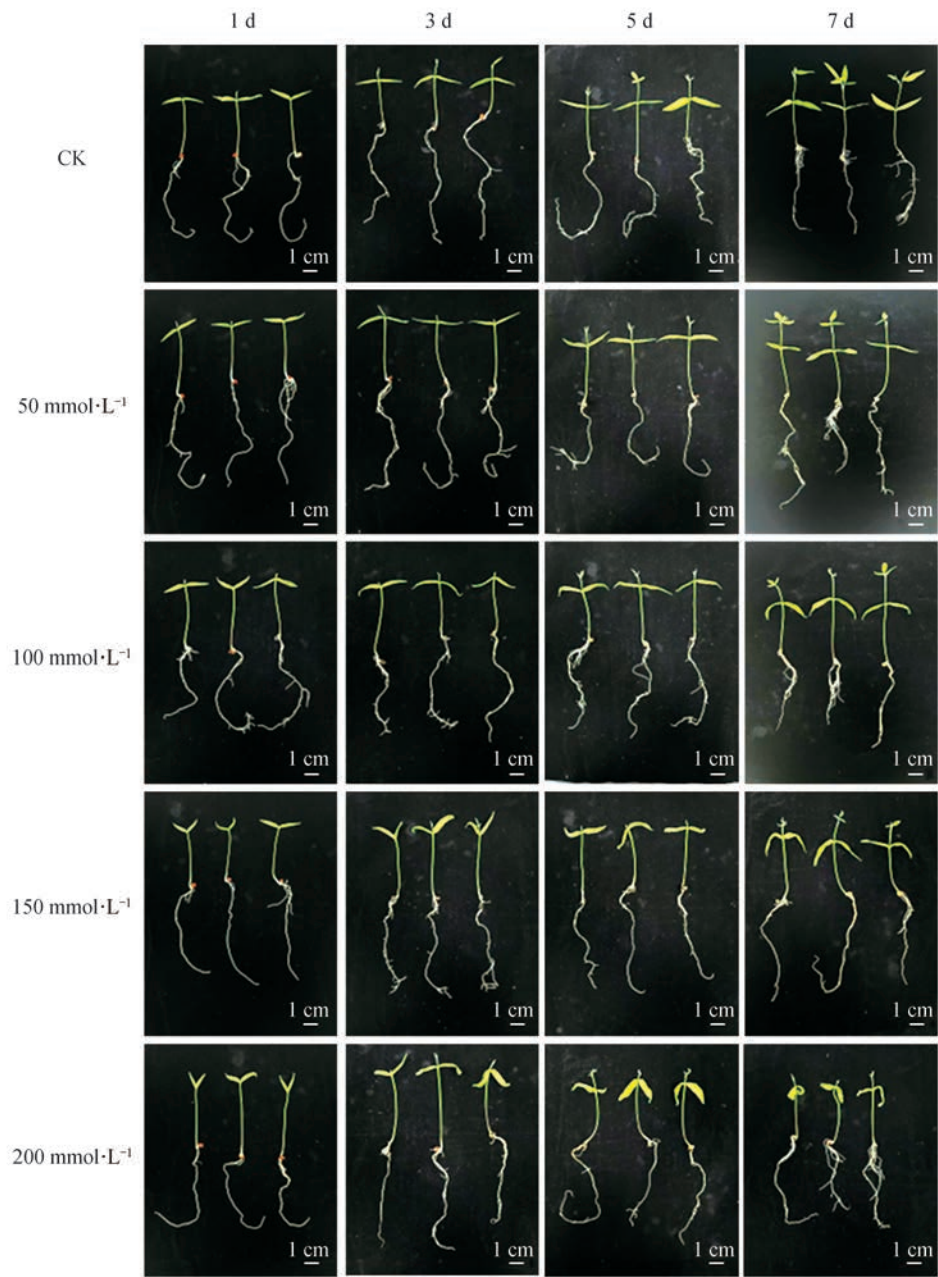


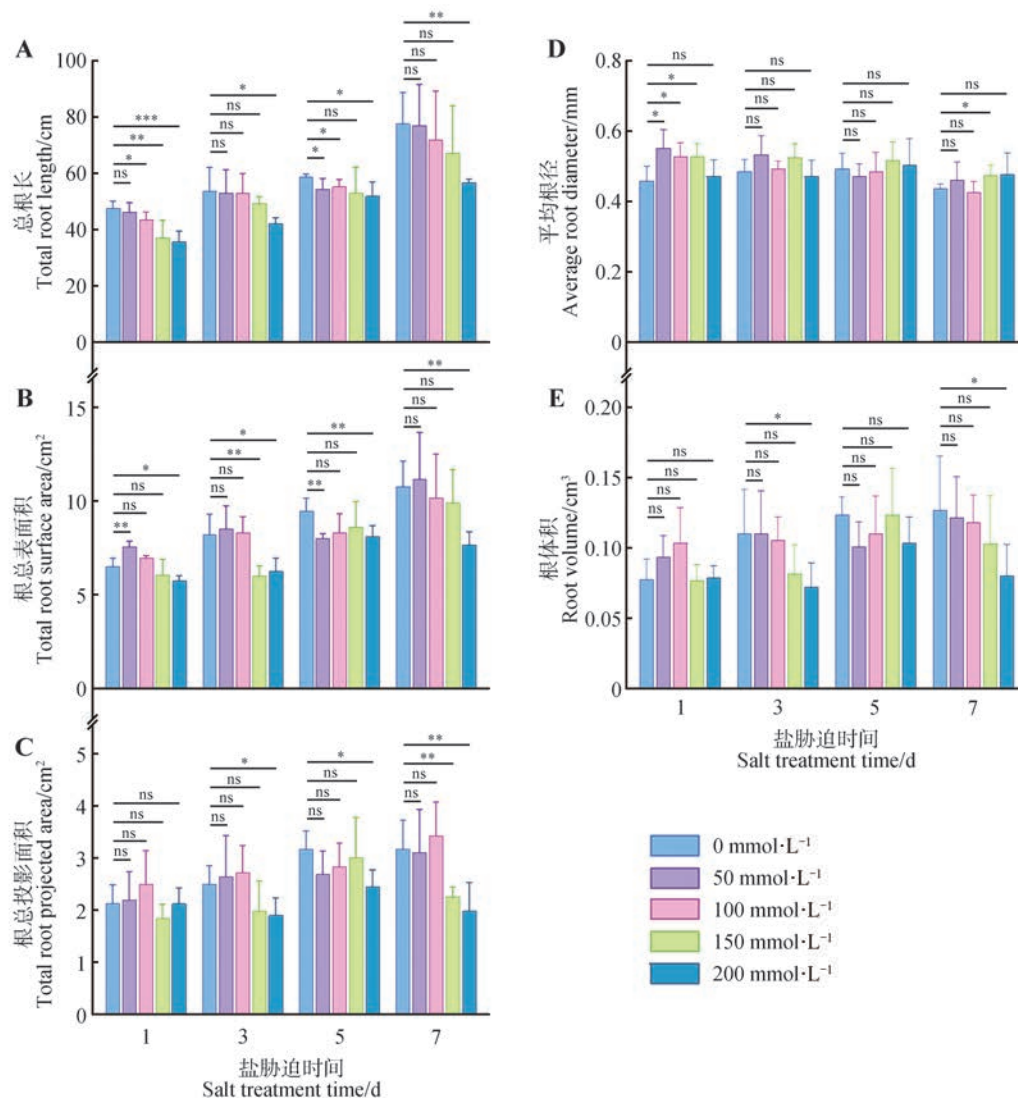
图1 不同浓度NaCl处理下木豆幼苗在不同时间的表型变化

Fig.1 Phenotypic changes of pigeon pea seedlings under different NaCl concentrations over time

2.2 盐胁迫下木豆根系形态指标变化

如图2所示,盐胁迫对木豆根系生长产生了明

显影响,且不同指标对盐浓度和处理时间的响应存在一定差异。



采用 *t* 检验判定统计学显著性。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ 。

Statistical significance was determined using Student's *t*-test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

图2 不同浓度NaCl处理下木豆根系形态指标变化

Fig.2 Change of root morphological traits of pigeon pea under salt stress

随着处理时间延长,各处理组总根长整体呈增加趋势,说明木豆根系在短期盐胁迫下仍具有一定生长能力。然而,高浓度盐(尤其200 mmol·L⁻¹)明显抑制根系伸长。1 d时不同处理间已出现显著差异,高盐处理根长最低;至7 d时,0~100 mmol·L⁻¹ NaCl处理下根长维持较高水平,而150、200 mmol·L⁻¹ NaCl处理下明显下降,表明较高浓度盐会持续抑制根系纵向生长。这说明盐胁迫通过影响根尖细胞分裂与伸长活动,限制根系扩展能力。

根总表面积和根总投影面积变化趋势与根长变化基本一致。随着时间延长,低盐或中低盐处理下根表面积逐渐增大,说明根系仍可通过扩大吸收面积适应逆境环境;而高盐处理下根表面积和投影面积增长受限,尤其200 mmol·L⁻¹ NaCl处理下始终保持较低水平。7 d时根系性状差异更加明显,说明高盐环境会抑制侧根发生和根毛发育,降低根系对水分和矿质元素的吸收能力。

平均根径变化相对较小,各处理间大多差异不显著,说明盐胁迫对根系粗细的影响弱于对根

系长度和扩展面积的影响。但在1 d时部分盐处理根径略高于对照,推测可能是盐胁迫初期细胞渗透调节导致根组织轻微膨大,从而使平均根径增加。随着处理时间延长,各处理间差异逐渐减弱,说明根径变化并不是木豆响应盐胁迫的主要适应方式。

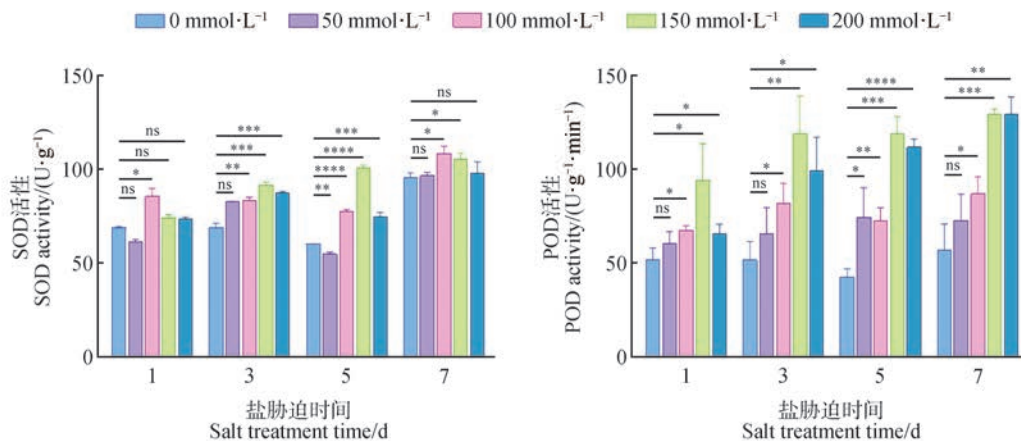
根体积结果表明,中低浓度($50\sim 100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)盐处理下,木豆在部分时期能够维持较高根体积,说明适度盐胁迫可能诱导根系代偿性生长;但高浓度(尤其 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)盐显著降低根体积,且在7 d时降幅最明显。这表明持续高盐环境会抑制根系生物量积累,影响根系整体活力。

综合分析可知,木豆根系形态对盐胁迫表现出明显的浓度依赖性和时间依赖性。低盐或中低盐处理下,木豆仍能维持较好的根系生长,表现出一定耐盐适应能力;而高盐处理则显著抑制根长、根表面积和根体积等指标,说明盐胁迫通过限制根系扩展和吸收面积,进而影响植株对水分和养分的获取。相比之下,平均根径变化较小,说明木豆主要通过调节根系生长规模而非改变根系粗细

来响应盐胁迫。整体结果表明,根系形态指标能够较好地反映木豆对盐胁迫的适应能力,其中根长、表面积和根体积对盐胁迫较为敏感,可作为评价木豆耐盐性的关键指标。

2.3 盐胁迫下木豆抗氧化酶活性变化

对于SOD活性而言,在处理初期1 d时,各处理间差异不明显,但 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下略高,为 $85.68\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,表明适度盐胁迫可在一定程度上诱导SOD活性升高。至3 d时,SOD活性在中高浓度盐处理下明显升高,其中 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下达到较高水平,为 $91.51\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,高于对照的 $68.30\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在5 d时, $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下显著升高至 $100.68\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,为各处理最高值,而其他处理下变化相对较小。至7 d,各处理组SOD活性均有所升高,其中 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下达到最高值,为 $108.66\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 150 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下也维持较高水平(图3)。总体来看,SOD活性随盐浓度升高呈先升高后趋于稳定的趋势,说明其在清除活性氧、缓解氧化胁迫过程中发挥重要作用。



采用 t 检验判定统计学显著性。*, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$ 。

Statistical significance was determined using Student's t -test. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$ 。

图3 不同浓度NaCl处理下木豆幼苗生理指标变化

Fig.3 Physiological changes in pigeon pea seedlings under different NaCl concentrations

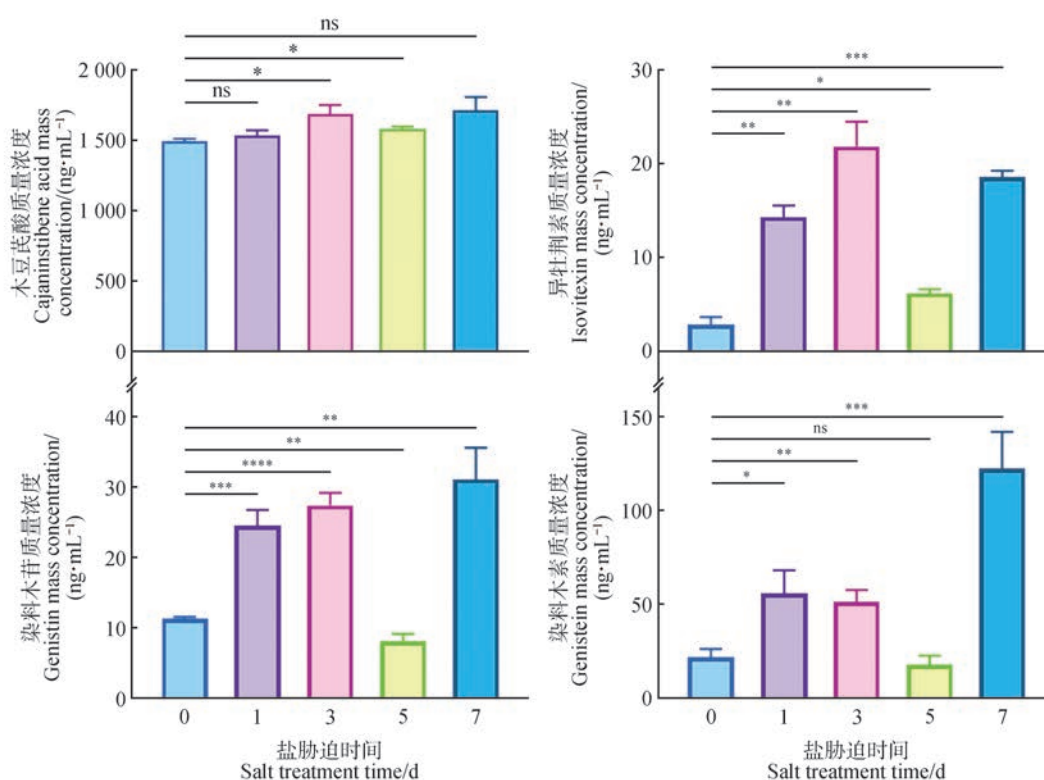
对于POD活性而言,其变化幅度更为显著(图3)。1 d时,随着盐浓度升高,POD活性总体呈上升趋势,其中 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下POD活性为 $94.22\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,显著高于其他处理。至3 d时,各处理组POD活性进一步升高, 150 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下分别达到 119.11 、 $99.56\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,明显高于对照。5 d时,高浓度盐处理下POD活性仍

维持较高水平,其中 150 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下POD活性分别为 119.11 、 $112.00\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。至7 d时,POD活性在 150 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下达到最高值(均为 $129.78\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$),显著高于其他处理组。总体来看,POD活性随盐浓度和处理时间的增加持续升高,表现出明显的剂量效应和时间效应。

2.4 盐胁迫下木豆黄酮积累量变化

盐胁迫下木豆黄酮积累量的变化如图4所示,木豆芪酸质量浓度在整个处理过程中保持较高水平,由0 d的 $1\,492.26\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上升至3 d的 $1\,688.71\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,在5 d时下降至 $1\,580.98\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,随后在7 d时再次升高至 $1\,714.06\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,整体呈波动上升趋势,说明其在盐胁迫响应过程中可能持续发挥重要作用。异牡荆素质量浓度变化幅度较大,由初始的 $2.84\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 显著升高至1 d的 $14.28\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,并在3 d时达到较高水平 $21.81\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,随后在5 d时明显下降至 $6.16\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,至7 d再次

回升至 $18.57\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明其对盐胁迫具有较为敏感的反应特性。染料木苷质量浓度总体呈上升趋势,从0 d的 $11.22\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加至3 d的 $27.35\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,在5 d时短暂下降至 $8.02\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,随后在7 d时达到最高值 $31.04\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,显示出明显的诱导积累效应。染料木素质量浓度变化最为显著,由0 d的 $21.52\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 快速升高至1 d的 $55.66\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,在3 d时略微下降至 $51.02\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,在5 d时明显降低至 $17.71\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,而在7 d时急剧上升至 $122.27\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,远高于其他时间点,说明其可能在后期盐胁迫响应中发挥关键作用。



采用 t 检验判定统计学显著性。*, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, ****, $P<0.0001$ 。

Statistical significance was determined using Student's t -test. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, ****, $P<0.0001$.

图4 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ 处理下木豆黄酮积累量变化

Fig.4 Changes in flavonoid accumulation in pigeon pea under $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ treatment

2.5 盐胁迫下木豆黄酮类代谢物与抗氧化酶的相关性分析

相关性分析结果如图5所示,各指标之间呈现出明显的模块化特征与功能分化趋势,反映了盐胁迫下木豆抗氧化系统与黄酮代谢之间的复杂调控关系。黄酮类代谢物水平之间相关性较强,异牡荆素与染料木苷水平($r=0.92$)、染料木苷与染料木素水平($r=0.82$)均呈显著正相关,表明不同黄酮

组分可能来源于相近的生物合成途径,并在盐胁迫下表现出协同积累特征;木豆芪酸与其他黄酮成分之间亦表现出中等偏高的正相关($r=0.59\sim 0.70$),提示其在胁迫过程中可能作为相对稳定的基础性代谢物持续参与响应。抗氧化酶系统方面,SOD与POD活性之间呈极显著正相关($r=0.96$),说明二者在活性氧清除过程中具有高度协同作用,共同构成酶促防御体系的核心。然而,在与黄

酮代谢的关系上,不同抗氧化组分表现出明显差异:POD活性与木豆芪酸($r=0.838$)及染料木素水平($r=0.402$)呈正相关,表明其可能与部分黄酮物质协同参与过氧化氢清除及后期防御过程;相比

之下,SOD活性与异牡荆素($r=-0.07$)和染料木苷水平($r=-0.11$)呈负相关,说明在以SOD为主导的早期抗氧化阶段,这些黄酮的积累与其响应不同步,甚至可能存在一定的功能替代或补偿关系。

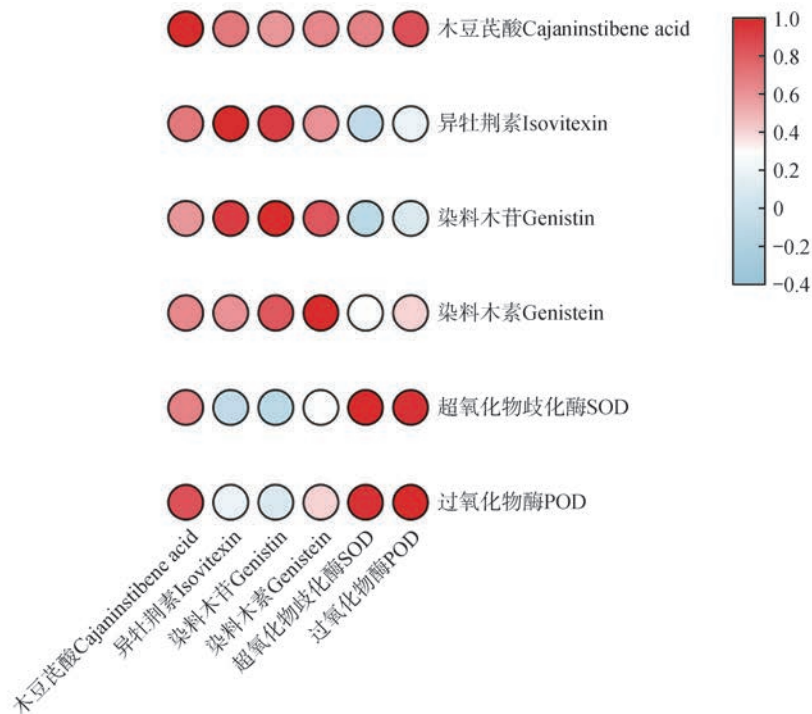


图5 木豆黄酮类代谢物水平和抗氧化酶活性的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis of flavonoid metabolites content and antioxidant enzyme activity of pigeon pea

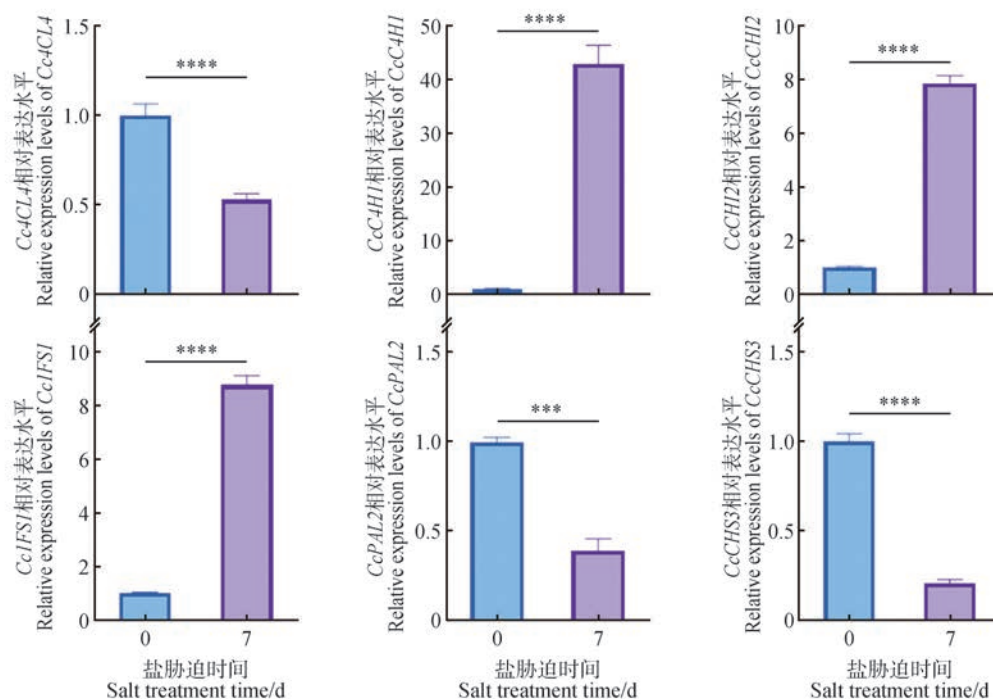
2.6 盐胁迫下木豆黄酮通路关键酶基因表达差异分析

在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫处理 7 d 后,各基因相较于 0 d 均表现出显著差异性变化(图 6)。Cc4H1 表达量上升约 42.15 倍,为所有基因中上调幅度最大,表明其在盐胁迫响应中被强烈诱导,可能成为黄酮通路中较为关键的调控节点之一;CcCHI2 表达量上升约 8.23 倍,CcIFS1 上升约 9.12 倍,均表现出显著上调,表明下游分支尤其是异黄酮合成途径被有效激活。相比之下,Cc4CL4 表达量下降约 52%,CcPAL2 下降约 41%,CcCHS3 则下降约 20%,表明这些基因在盐胁迫下受到抑制。这种表达模式说明,在盐胁迫条件下并非整个通路同步增强,而是优先保证特定抗逆代谢物的合成。其中,Cc4H1 高达 40 倍以上的上调,可能在增强对底物转化效率、提高中间体供应方面发挥作用,而 CcIFS1 约 9.12 倍的上调则直接驱动染料木素等关键代谢物的积累。

3 讨论

盐胁迫是限制豆科作物生长和产量形成的重要非生物胁迫之一,其主要通过渗透胁迫、离子毒害及氧化损伤等途径影响植物正常生理代谢过程。本研究从表型、生理、代谢及分子层面对木豆响应盐胁迫的机制进行了系统分析。

在表型层面,高浓度 NaCl 处理显著抑制木豆幼苗根系及地上部生长,表现为主根伸长受阻、侧根发育受限及整体生物量下降,并且抑制效应随处理时间延长而进一步加剧。这一结果与大豆在盐胁迫下的研究结果^[20]较为一致。已有研究^[20]表明,高盐环境会降低细胞外水势,导致细胞失水、膨压下降及细胞分裂和伸长受阻,同时大量 Na^+ 积累会破坏 Na^+/K^+ 离子稳态,从而影响酶活性及膜系统稳定性。本研究中木豆在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上 NaCl 处理下出现明显生长抑制,说明高盐条件下离子毒害已超过细胞稳态调控能力。然而,在低盐条件下部分根系指标短期内出现促进效应,这



采用 t 检验判定统计学显著性。***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$ 。

Statistical significance was determined using Student's t -test. ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$.

图6 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理木豆下黄酮途径基因相对表达量变化

Fig.6 Changes in the relative expression levels of flavonoid pathway genes in pigeon pea under salt treatment

与部分耐盐植物在轻度胁迫条件下通过增强根系扩展提高水分获取能力的情况相似,说明木豆在轻度盐胁迫下仍具有一定适应性调节潜力。

盐胁迫下,细胞ROS会大量积累,这些分子在过量时会引发膜脂过氧化、蛋白质失活及核酸损伤。因此,维持ROS的动态平衡成为植物耐逆的重要基础。为此,植物进化出以SOD、CAT和POD为核心的酶促抗氧化防御体系^[21]。其中,SOD作为第一道防线,催化 O_2^- 迅速歧化生成 H_2O_2 和 O_2 ,有效降低高反应性自由基的毒性^[22]。随后, H_2O_2 作为相对稳定的ROS中间体,需要通过CAT或POD进一步清除。CAT主要在过氧化物酶体中发挥作用,具有高催化效率,能够在高浓度 H_2O_2 条件下快速将其分解为 H_2O 和 O_2 ,而POD则分布更为广泛,其利用多种酚类或抗坏血酸等作为电子供体参与 H_2O_2 清除^[23]。本研究发现,盐胁迫显著诱导木豆抗氧化酶活性变化,其中SOD在中等盐浓度下迅速升高并趋于稳定,而POD活性则在高盐条件下持续增强,二者在不同阶段协同清除过量活性氧,这种协同调控有助于维持细胞氧化还原稳态,降低膜脂过氧化损伤。类似的动态变化模

式在其他植物中均有报道。例如,Mittova等^[24]在‘潘那利’番茄(*Lycopersicon pennellii*)中的研究发现,盐胁迫能够显著提高SOD、抗坏血酸过氧化物酶(APX)及POD等抗氧化酶活性,从而缓解ROS积累造成的膜脂过氧化损伤。Gharsallah等^[25]进一步指出,不同番茄基因型在盐胁迫下抗氧化酶响应强度存在明显差异,耐盐品种通常表现出更高的SOD和POD活性。水稻(*Oryza sativa*)中的研究^[26]也表明,耐盐品种能够通过维持较高抗氧化酶活性降低氧化损伤水平,从而提高盐胁迫适应能力。

近年来的研究表明,除酶促抗氧化体系之外,黄酮类代谢物在植物耐逆过程中同样发挥重要作用。黄酮不仅通过清除ROS减轻氧化损伤,还能够通过稳定细胞膜结构及调节信号转导参与逆境适应过程。例如,异黄酮类物质已被证实在植物中通过清除自由基和调节氧化还原平衡显著增强耐盐能力^[27]。染料木素作为重要异黄酮信号分子,可在盐胁迫条件下参与逆境适应相关信号调控,缓解大豆(*Glycine max*)与根瘤菌的共生体系受损,提高根瘤形成及植株生长能力^[28]。在本研究中,多种黄酮类物质在盐胁迫下表现出显著的

阶段性积累特征,不同代谢物响应模式存在差异,如木豆芪酸水平持续上升,可能参与长期抗氧化防御;异牡荆素水平波动较大,可能对胁迫变化较为敏感;而染料木苷和染料木素,尤其是后期显著积累的染料木素,可能在持续或加重胁迫条件下发挥关键保护作用。

进一步分析盐胁迫下黄酮通路关键结构基因的表达变化发现,*CcC4H1* 相对表达量显著上升约 42.15 倍,为上调幅度最大的基因,表明其在盐胁迫响应过程中可能处于关键调控位置;*CcCHI2* 与 *CcIFS1* 相对表达量分别上升约 8.23 倍和 9.12 倍,说明黄酮下游分支尤其是异黄酮合成途径被显著激活。相比之下,*CcPAL2* 和 *Cc4CL4* 相对表达量均显著下降 41%~52%,*CcCHS3* 相对表达量显著下降约 20%,表明上游苯丙烷途径及部分结构基因受到抑制。类似的表达模式在大豆盐胁迫相关研究也有报道,对盐胁迫条件下大豆转录组与代谢组联合分析发现,PAL、CHS 等酶上游结构基因表达并未持续增强,而 C4H、CHI 及 IFS 等与异黄酮合成相关的酶关键基因表达则显著上调,并伴随染料木素等异黄酮类代谢物大量积累^[29],说明植物在逆境条件下并非简单提高整个苯丙烷途径活性,而是通过代谢流重分配优先保证特定抗逆代谢物的合成。一方面,上游关键入口酶受到抑制,限制了碳流的过度输入。另一方面,*CcC4H1* 表达显著上调,以及 *CcIFS1* 表达持续增强,使代谢流优先向异黄酮合成分支集中,从而促进特定抗逆相关代谢物的积累。其中,*CcC4H1* 表达大幅上调可能有助于提高中间代谢物供给能力,而 *CcIFS1* 表达增强则直接驱动染料木素等关键黄酮类物质的合成。

综合来看,盐胁迫通过渗透胁迫与离子毒害的协同作用显著抑制木豆幼苗生长,但植物通过构建多层次协同防御体系实现适应性响应。在生理层面,ROS 爆发诱导 SOD 与 POD 等抗氧化酶系统动态激活,从而维持细胞氧化还原稳态。在代谢层面,黄酮类物质呈阶段性积累并与抗氧化酶体系形成互补防御网络。在分子层面,黄酮通路关键基因发生显著重编程,表现为上游通量受限而下游异黄酮合成分支被选择性增强。本研究从形态、生理、代谢及分子层面系统阐明了木豆响应盐胁迫的适应策略,不仅为深入理解豆科作物耐盐机制提供了试验依据,也为耐盐种质筛选及盐碱地农业生产提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] Hassani A, Azapagic A, Shokri N. Global predictions of primary soil salinization under changing climate in the 21st century[J]. *Nature Communications*, 2021, 12:6663.
- [2] Shokri N, Hassani A, Sahimi M. Multi-scale soil salinization dynamics from global to pore scale: a review[J]. *Reviews of Geophysics*, 2024, 62(4):e2023RG000804.
- [3] Zhou H P, Shi H F, Yang Y Q, *et al.* Insights into plant salt stress signaling and tolerance[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2024, 51(1):16-34.
- [4] Singh D. Juggling with reactive oxygen species and antioxidant defense system: a coping mechanism under salt stress[J]. *Plant Stress*, 2022, 5:100093.
- [5] Wang H Q, Sun J, Ren H, *et al.* Inhibiting reactive oxygen species production mitigates endoplasmic reticulum damage in florets of developing maize ears under heat stress[J]. *The Plant Journal*, 2025, 122(5):e70243.
- [6] Lu X, Chen G P, Ma L, *et al.* Integrated transcriptome and metabolome analysis reveals antioxidant machinery in grapevine exposed to salt and alkali stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 2023, 175(3):e13950.
- [7] Zhang X Y, He P Y, Guo R Y, *et al.* Effects of salt stress on root morphology, carbon and nitrogen metabolism, and yield of Tartary buckwheat[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13:12483.
- [8] Zhang L, Zhang Z J, Fang S Z, *et al.* Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals molecular regulatory mechanism of flavonoid biosynthesis in *Cyclocarya paliurus* under salt stress[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 170:113823.
- [9] Wang C L, Wei X T, Wang Y M, *et al.* Metabolomics and transcriptomic analysis revealed the response mechanism of maize to saline-alkali stress [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(12):5397-5416.
- [10] Su L T, Lv A M, Wen W W, *et al.* MsMYB206-MsMYB450-MsHY5 complex regulates alfalfa tolerance to salt stress *via* regulating flavonoid biosynthesis during the day and night cycles [J]. *The Plant Journal*, 2025, 121(2):e17216.
- [11] Zheng X Y, Zhang X J, Zeng F K. The regulatory network composed of phytohormones, transcription factors and non-coding RNAs is involved in the flavonoids biosynthesis of fruits[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2026, 12(3):497-508.
- [12] Liu C, Tai Y L, Luo J J, *et al.* Integrated multi-omics analysis provides insights into genome evolution and phosphorus deficiency adaptation in pigeonpea (*Cajanus cajan*) [J]. *Horticulture Research*, 2022, 9:uhac107.

- [13] Awana M, Jain N, Samota M K, *et al.* Protein and gene integration analysis through proteome and transcriptome brings new insight into salt stress tolerance in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 3589-3602.
- [14] Du T T, Fan Y X, Cao H Y, *et al.* Transcriptome analysis revealed key genes involved in flavonoid metabolism in response to jasmonic acid in pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 168: 410-422.
- [15] Yang W L, Li N, Fan Y X, *et al.* Transcriptome analysis reveals abscisic acid enhancing drought resistance by regulating genes related to flavonoid metabolism in pigeon pea [J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 191: 104627.
- [16] Meng D, Dong B Y, Niu L L, *et al.* The pigeon pea Cc-CIPK14-CcCBL1 pair positively modulates drought tolerance by enhancing flavonoid biosynthesis [J]. The Plant Journal, 2021, 106(5): 1278-1297.
- [17] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants [J]. Plant Physiology, 1977, 59(2): 309-314.
- [18] Liu C X, Gu C Y, Huang W, *et al.* Targeted UPLC-MS/MS high-throughput metabolomics approach to assess the purine and pyrimidine metabolism [J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1113: 98-106.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Khan F, Siddiqi T O, Mahmooduzzafar, *et al.* Morphological changes and antioxidant defence systems in soybean genotypes as affected by salt stress [J]. Journal of Plant Interactions, 2009, 4(4): 295-306.
- [21] Lan J Q, Qin G J. The regulation of CIN-like TCP transcription factors [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4498.
- [22] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930.
- [23] Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(11): 534-540.
- [24] Mittova V, Tal M, Volokita M, *et al.* Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species [J]. Physiologia Plantarum, 2002, 115(3): 393-400.
- [25] Gharsallah C, Fakhfakh H, Grubb D, *et al.* Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars [J]. AoB Plants, 2016, 8: plw055.
- [26] Demiral T, Türkan İ. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance [J]. Environmental and Experimental Botany, 2005, 53(3): 247-257.
- [27] 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.
- [28] Miransari M, Smith D L. Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)-*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis, using signal molecule genistein [J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45(2): 146-152.
- [29] Wang Y B, Liu W, Li W, *et al.* Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals regulatory mechanisms of flavonoid biosynthesis in soybean under salt stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1415867.