作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2022, 48(8): 2016–2027 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2022.12041

褪黑素和茉莉酸甲酯基质育秧对水稻耐低温胁迫的调控作用

朱春权[1,**] 魏倩倩[1,2,**] 项兴佳[2] 胡文君[3] 徐青山[1] 曹小闯[1] 朱练峰[1]
孔亚丽[1] 刘 佳[4] 金千瑜[1] 张均华[1,*]

[1] 中国水稻研究所 / 水稻生物学国家重点实验室, 浙江杭州 310006; [2] 安徽大学, 安徽合肥 230039; [3] 浙江省农业科学院, 浙江杭州 310021; [4] 江西省农业科学院, 江西南昌 330200

摘 要: 早稻育秧过程中易遭受低温冷害, 引起水稻减产。因此, 有必要研制耐低温的水稻育秧基质来保障早稻生产。本研究以我们实验室自己研制的发酵基质作为研究对象, 外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后, 分别在水稻萌发阶段和水稻生长 7 d 后进行为期 3 d 的低温处理, 然后测定水稻的萌发状况、理化性质和基因表达, 从而明确 2 种不同激素对早稻秧苗耐低温胁迫的调控机制。结果表明, 褪黑素和茉莉酸甲酯均显著提高水稻在低温条件下的发芽率和发芽势; 两者均能提高水稻在低温条件下的生长, 包括提高株高、根长、根条数、干物重、叶龄和养分含量。在低温条件下, 褪黑素和茉莉酸甲酯均能通过调节水稻体内抗氧化系统酶的活性和降低水稻体内过氧化氢与丙二醛含量来缓解低温胁迫导致的脂质过氧化损伤。褪黑素和茉莉酸甲酯均能提高低温条件下水稻体内的脯氨酸含量和叶绿素含量, 降低脱落酸的含量, 而茉莉酸甲酯则单独提高了水稻体内 GA_3 的含量。褪黑素和茉莉酸甲酯对水稻耐冷基因存在不同的调控作用, 在低温条件下, 两者均显著上调 *OsCDPK7* 和 *OsLti6b*, 显著下调 *OsWRKY45* 基因的表达, 褪黑素单独上调 *OsFer1* 基因的表达, 茉莉酸甲酯单独上调 *OsTrx23* 基因的表达。以上结果表明, 褪黑素和茉莉酸甲酯均能通过调控水稻体内抗氧化系统酶活、渗透物质含量、叶绿素含量、植物激素含量和耐冷基因表达提高水稻耐低温胁迫能力。

关键词: 基质; 水稻; 低温胁迫; 理化性质; 抗氧化酶; 基因表达

Regulation effects of seedling raising by melatonin and methyl jasmonate substrate on low temperature stress tolerance in rice

ZHU Chun-Quan[1,**], WEI Qian-Qian[1,2,**], XIANG Xing-Jia[2], HU Wen-Jun[3], XU Qing-Shan[1], CAO Xiao-Chuang[1], ZHU Lian-Feng[1], KONG Ya-Li[1], LIU Jia[4], JIN Qian-Yu[1], and ZHANG Jun-Hua[1,*]

[1] State Key Laboratory of Rice Biology / China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, Zhejiang, China; [2] Anhui University, Hefei 230039 Anhui, China; [3] Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China; [4] Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, Jiangxi, China

Abstract: Early rice easily suffers from low temperature injury at seedling raising stage, resulting in yield reduction. Therefore, it is necessary to develop low temperature tolerant rice seedling substrate to ensure early rice production. The fermentation substrate made by ourselves was used in the present study. After melatonin and methyl jasmonate were added in the substrate, the rice was treated with low temperature for 3 days at seed germination stage and 7 days' growth stage. Then, to clarify the regulatory mechanism of these two phytohormones on the tolerance of early rice seedlings to low temperature stress, the germination status, physical and chemical properties, and gene expression of rice were explored. The results showed that both melatonin and methyl jasmonate could significantly improve the seed germination rate and germination potential of rice under low temperature. Both could improve the growth of rice, including plant height, root length, root number, dry matter weight, leaf age, and nutrient content.

本研究由国家自然科学基金项目(31901452)和浙江省自然科学基金项目(LQ19C020007)资助。
This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31901452) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ19C020007).

* 通信作者(Corresponding author): 张均华, E-mail: zhangjunhua@caas.cn
** 同等贡献(Contributed equally to this work)
第一作者联系方式: 朱春权, E-mail: zhuchunquan@caas.cn; 魏倩倩, E-mail: 15955803543@163.com

Received (收稿日期): 2021-06-16; Accepted (接受日期): 2021-11-29; Published online (网络出版日期): 2021-12-28.
URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20211227.1952.006.html

Under low temperature, melatonin and methyl jasmonate both reduced hydrogen peroxide and malondialdehyde content in rice by regulating the activities of antioxidant system enzymes, so as to alleviate the lipid peroxidation damage caused by low temperature stress. Melatonin and methyl jasmonate both increased the contents of proline and chlorophyll, and decreased the content of abscisic acid in rice under low temperature stress. Methyl jasmonate along increased GA_3 content in rice under low temperature conditions. Melatonin and methyl jasmonate had different regulatory effects on cold tolerance genes expression in rice. Both of them significantly up-regulated the relative expression of *OsCDPK7* and *OsLti6b* genes, and down-regulated the expression of *OsWRKY45* gene in rice under low temperature conditions. In addition. The relative expression of *OsFer1* gene was induced by melatonin alone, while the relative expression of *OsTrx23* gene was up-regulated by methyl jasmonate alone in response to low temperature stress. The above results showed that both melatonin and methyl jasmonate could improve the low temperature stress tolerance of rice by regulating the enzyme activity of antioxidant system, osmotic substance content, chlorophyll content, plant hormone content and the expression of cold tolerance genes in rice.

Keywords: substrate; rice; low temperature stress; physical and chemical properties; antioxidant enzymes; gene expression

水稻是喜温性作物, 在生长过程中对温度条件要求非常高。在低温胁迫下, 水稻的分蘖数和有效穗数均显著降低, 最终导致水稻减产约 20%~50% [1-2]。我国的早稻面积约 446.7 万公顷, 占全国全年水稻种植面积的 15.2% [3]。早稻生产过程中极易遭受“倒春寒”, 从而降低水稻秧苗素质, 甚至引起死苗。缓解早稻生产过程中, 尤其是育秧过程中的低温胁迫对保障我国粮食安全具有重要意义。

褪黑素又称松果体素, 其由色胺在色氨酸羟化酶的作用下转化成 5-羟色胺, 然后依次通过氨基酸脱羧酶和芳香基胺 N-乙酰转移酶将 5-羟色胺转化为乙酰血清素, 最终通过乙酰血清素 O-甲基转移酶催化合成[4]。褪黑素广泛存在于植物体中, 参与调节植物的生理活动和响应非生物胁迫, 比如促进植物光合作用、缓解植物重金属胁迫和极端温度胁迫等[5-7]。茉莉酸甲酯是一种脂肪酸衍生物, 其主要合成方式包括通过亚麻酸被氧化形成茉莉酸, 而后通过茉莉酸羧基甲基转移酶合成茉莉酸甲酯或者直接由十六碳三烯酸合成茉莉酸甲酯[8]。茉莉酸甲酯同样广泛存在于植物中, 并参与调节植物生长发育和缓解植物非生物胁迫, 比如缓解植物重金属胁迫和极端温度胁迫等[9-10]。褪黑素和茉莉酸甲酯均参与调控植物响应极端温度胁迫, 因此在水稻耐低温过程中可能发挥重要作用。

水稻机械化插秧是水稻全程机械化生产中重要一环, 是未来水稻生产的必然趋势。培育用于机插秧苗的育秧基质对保障水稻机械化插秧的顺利进行具有重要作用, 其主要包括传统育秧基质与新型育秧基质。传统育秧基质是一种由土和肥料混合而成的营养土, 但其面临着取土困难、工序复杂等局限性[11]。新型育秧基质包括 3 种, 分别是由蛭石、珍珠岩、沸石等组成的无机基质; 由动物粪便、秸秆、草木灰等组成的有机基质; 以及由无机基质和有机基质混合而成的复合基质[12]。与常规基质相比, 新型育秧基质解决了取土难的难题, 并且能够促进水稻根系发育和提高有效穗数, 进而提高水稻产量[13]。因此, 新型育秧基质对提高水稻机插种植产量具有重要意义。前期我们的研究发现, 不同的育秧基质对水稻秧苗耐低温胁迫能力存在不同的调节作用, 相比较单纯的营养土育秧, 我们自制的无土基质和发酵基质均能通过提高水稻抗氧化胁迫能力和提高耐冷基因的表达来提高水稻秧苗的耐冷性[14]。因此, 在本研究中, 我们在自制的发酵基质中外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯, 以确认这 2 种激素是否可以提高水稻的耐低温能力, 同时探讨相应的生理和分子机制, 从而通过制作耐低温的育秧基质提高水稻秧苗的耐冷性, 最终保障早稻生产。

1　材料与方法

1.1　试验设计

供试材料为‘中早 39’, 籼型常规早稻品种, 中国水稻研究所育成。本试验所用秧盘尺寸为 58 cm × 28 cm × 3 cm, 育秧基质为自己研制的发酵基质。发酵基质以水洗草炭为原料, 利用微生物发酵以后, 添加不同的生物质材料、营养元素、保水剂和促根剂等制成。其基本理化性质如下: pH 6.28±0.48, 电导率 (2.07±0.05) mS cm^{-1}, 容重(0.72±0.01) g cm^{-3}, 总孔隙度 57.68%±0.47%, 通气孔隙度 24.63%±0.34%, 持水孔隙度 33.05%±0.61%, 碱解氮含量(456.75±21.40) mg kg^{-1}, 速效磷含量(371.25±3.26) mg kg^{-1}, 速效钾含量(4029.87±104.36) mg kg^{-1}, 总氮含量 10.24 g kg^{-1}, 总磷含量 8.57 g kg^{-1}, 总钾 13.21 g kg^{-1}, 有机质含量 21.69%±2.64%。按质量比在基质中分别添加 0.001% 褪黑素和 0.0005%茉莉酸甲酯。

实验设计分为两部分: (1) 萌发期低温处理实验: 将水稻种子催芽至露白后, 每个秧盘播种 1000 粒种

子, 2021 年 3 月 29 日播种后将秧盘置于不同温度处理的培养箱中培养 3 d, 然后取出秧盘, 置于中国水稻研究所温室大棚中正常培养, 在低温处理结束后的 7 d 内每天记录发芽的种子数, 然后根据公式计算发芽率和发芽势。(2) 幼苗期低温处理实验: 将水稻种子催芽至露白后, 每个秧盘播种 110 g 谷芽, 2021 年 3 月 29 日播种后在中国水稻研究所温室大棚中正常培养, 培养 7 d 后将秧盘放入不同温度的培养箱中进行处理, 3 d 后将秧盘取出, 取苗测定不同指标。不同温度试验设计见表 1。每个实验均设 3 个生物学重复。

表 1 实验设计方案
Table 1 Scheme of experimental designs

处理 Treatment	温度 Temperature (℃)		时间 Time (h)	
	白天 Day	晚上 Night	白天 Day	晚上 Night
常温 N	30	20	12	12
常温+褪黑素 N+T	30	20	12	12
常温+茉莉酸甲酯 N+M	30	20	12	12
低温 L	13	7	12	12
低温+褪黑素 L+T	13	7	12	12
低温+茉莉酸甲酯 L+M	13	7	12	12

N: normal temperature; T: melatonin; L: low temperature; M: methyl jasmonate.

1.2 萌发实验相关参数测定

各处理秧盘在低温下处理 3 d 后移入温室中进行正常培养, 从此时开始记录每天的种子发芽数, 总共记录 7 d。其中各指标的计算方法[15]如下: 发芽率(%) = (7 d 内发芽总数/供试种子数)×100; 发芽势(%) = (第 3 天发芽数/供试种子数)×100。

1.3 秧苗素质和养分测定

不同温度处理后, 每盘取代表性秧苗 20 株, 测定秧苗叶龄、株高、根长、根数、茎基宽, 每盘另取 100 株秧苗, 测定百株地上部干重和百株根部干重[16]。取水稻地上部和根部, 烘干至恒重后研磨, 利用浓硫酸和过氧化氢消煮后测定总氮、总磷和总钾含量[17]。取水稻秧苗叶片 0.2 g, 用石英沙研磨后加入 2 mL 95%乙醇, 研磨后静置离心, 取上清分别在 665 nm 和 649 nm 测定吸光度, 计算叶绿素含量[18]。

1.4 水稻生理指标的测定

分别收集水稻地上部鲜样, 用液氮研磨后提取酶粗提液, 相关酶活和抗氧化指标的测定根据朱春权等[14]、Nakano 和 Asada[19]和 Wang 等[20]的方法。其中, 可溶性蛋白含量的测定采用 BCA 法, 脯氨酸含量的测定采用茚三酮法, MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸法, SOD 酶活的测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法, CAT 酶活根据单位时间内 H_2O_2 的消耗进行测定, POD 酶活采用愈创木酚法进行测定, 谷胱甘肽 S-转移酶根据单位时间内还原型谷胱甘肽的减少量进行测定, APX 酶活的根据抗坏血酸含量的减少量进行测定, H_2O_2 含量的测定根据其与氯化钛生成黄色复合物沉淀, 而后用硫酸溶解后比色。脱落酸的和 GA_3 用甲醇进行提取后过 Sep-Park C18 柱, 滤液用氮气吹干后分别采用酶联免疫法进行测定[21-22]。

1.6 水稻耐冷基因表达测定

水稻新鲜根系剪下后立即用液氮进行研磨, 加入 TRIzol 后提取根系总 RNA。运用 NanoDrop 测定总 RNA 的含量以及纯度, 通过琼脂糖凝胶电泳法确定提取的总 RNA 的完整性。然后将总 RNA 反转成 cDNA (Prime Script 反转录试剂盒, TaKaRa, 日本), 运用 Sybgreen (TaKaRa, 日本)进行实时荧光定量 PCR[14]。所选基因的引物和内参基因引物见表 2, 测定后以 *OsHistone* 作为内参基因, 以常温条件下不添加褪黑素和茉莉酸甲酯的处理组作为对照。

1.6 统计学分析

试验数据采用 SPSS 21.0.0 软件进行统计分析(单因素方差分析), 均数采用图基(Tukey)检验统计学差异。图、表中不同字母表示处理间均值在 $P < 0.05$ 水平上有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 褪黑素和茉莉酸甲酯对低温下水稻萌发的影响

低温处理(白天 13℃/晚上 7℃)显著抑制水稻的发芽率, 即使处理后将秧盘移至大棚中进行正常培养, 其最终的发芽率也仅为 70.08%, 显著低于常温处理(白天 30℃/夜晚 20℃)下 93.25%的发芽率

表 2　水稻引物序列
Table 2　Sequence of primers in rice

基因 Gene	正向引物 Forward sequence (5'–3')	正向引物 Reverse sequence (5'–3')
OsCOLD1	CAGGATATCAAAAGCTTGGATG	GCAGCTATCTTTGCTTGACG
OsLti6b	GCCTTAAATTGGAGCTCAGTC	GTGCAGAAGATAAACTGGAGAA
OsWRKY45	TTCCTTGTTGATGTGTCGTCTCA	CCCCCAGCTCATAATCAAGAAC
OsFer1	GAGGAGACTGTGTGAAGGGC	ATATTGTTCCTTATTGGCTGCC
OsCDPK7	GAGGAAATCGCTGGGTTGA	TTCTCATTGTTCTTCGTCCGA
OsTrx23	AGAACACCATCGTGAAGCAC	CTATCTACAAGCTTGCCAGCAT
OsHistone	GGTCAACTTGTTGATTCCCCTCT	AACCGCAAAATCCAAAGAACG

表 3　不同处理对水稻萌发的影响
Table 3　Effects of different treatments on rice germination

处理 Treatment	发芽率 Germination rate (%)	发芽势 Germination potential (%)
常温 N	93.25±1.22 a	67.36±2.12 a
常温+褪黑素 N+T	92.78±1.38 a	69.24±1.85 a
常温+茉莉酸甲酯 N+M	93.74±1.67 a	69.58±1.97 a
低温 L	70.08±1.21 d	33.81±1.04 c
低温+褪黑素 L+T	77.41±1.42 c	44.52±1.18 b
低温+茉莉酸甲酯 L+M	84.23±1.24 b	43.98±1.26 b

处理同表 1。同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。
Treatments are the same as those given in Table 1. Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level. Abbreviations are the same as those given in Table 1.

(表 3)。同时, 低温处理显著降低了水稻发芽势, 从正常温度下的 67.36%降低为 33.81% (表 3)。外源施加褪黑素和茉莉酸甲酯不影响水稻在常温条件下的萌发, 但是显著提高了水稻在低温条件下的萌发, 并且 2 种激素的效果类似, 其中施加褪黑素的发芽率和发芽势分别提高了 10.46%和 31.68%, 施加茉莉酸甲酯后发芽率和发芽势分别提高了 20.19%和 30.08% (表 3)。

2.2　褪黑素和茉莉酸甲酯对低温下水稻的生长的影响

低温处理显著降低水稻的株高、根长、叶龄、地上部干重、地下部干重和根条数, 相应指标分别比常温处理下减少了 52.06%、15.50%、28.42%、31.37%、32.00%和 22.50% (表 4)。在基质中外源施加褪黑素后, 低温条件下水稻的株高、根长、叶龄、地上部干重、地下部干重、根条数分别增加了 22.14%、35.18%、25.74%、14.29%、26.47%和 23.34%, 外源添加茉莉酸甲酯后相应指标分别增加了 19.66%、49.89%、25.74%、12.86%、26.47%和 7.59% (表 4), 说明褪黑素和茉莉酸甲酯均显著提高了水稻秧苗在低温条件下的生长。在常温条件下, 褪黑素和茉莉酸甲酯均显著增加了水稻的根长, 分别增加了 9.91%和 34.95%, 但是茉莉酸甲酯对水稻的根系条数有显著的抑制作用(表 4), 说明褪黑素和茉莉酸甲酯在常温下对水稻的根系生长也存在调节作用。

在低温胁迫下, 外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后均显著增加水稻的株高和根长(图 1-A), 进一步证实了茉莉酸甲酯和褪黑素促进低温胁迫下水稻的生长(图 1-A)。同时, 低温处理显著降低了水稻叶片中叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的含量, 外源添加褪黑素后, 水稻叶片的叶绿素 *a* 和 *b* 含量分别增加了 15.41%和 13.32% (图 1-B, C), 外源添加茉莉酸甲酯后, 水稻叶片的叶绿素 *a* 和 *b* 含量分别增加了 7.72%和 5.15% (图 1-B, C)。常温条件下, 外源添加以上 2 种激素对水稻叶片叶绿素的含量没有显著影响(图 1-B, C)。

表 4 不同温度处理后水稻生长及质量

Table 4 Growth and weight parameters of rice under different temperature treatments

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	根长 Root height (cm)	叶龄 Leaf age (d)	地上部干重 Shoot weigh (g 100 plant^{-1})	根部干重 Root weigh (g 100 plant^{-1})	茎基宽 Shoot width (cm 5 plant^{-1})	根条数 Number of roots
常温 N	16.02±0.67 a	5.55±0.80 c	1.90±0.02 a	2.04±0.06 a	0.50±0.01 a	0.80±0.00 a	6.80±0.79 a
常温+褪黑素 N+T	15.69±0.86 a	6.10±0.77 b	1.86±0.09 a	2.06±0.09 a	0.50±0.01 a	0.80±0.00 a	7.19±0.56 a
常温+茉莉酸甲酯 N+M	15.88±0.91 a	7.49±0.85 a	1.90±0.00 a	2.07±0.10 a	0.51±0.01 a	0.80±0.00 a	6.55±0.69 b
低温 L	7.68±0.56 c	4.69±0.68 d	1.36±0.15 c	1.40±0.06 c	0.34±0.01 c	0.80±0.00 a	5.27±0.70 d
低温+褪黑素 L+T	9.38±0.92 b	6.34±0.99 b	1.71±0.16 b	1.60±0.04 b	0.43±0.01 b	0.80±0.01 a	6.50±0.51 b
低温+茉莉酸甲酯 L+M	9.19±0.71 b	7.03±0.48 a	1.71±0.18 b	1.58±0.05 b	0.43±0.01 b	0.78±0.02 a	5.67±0.72 c

处理同表 1。同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

Treatments are the same as those given in Table 1. Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

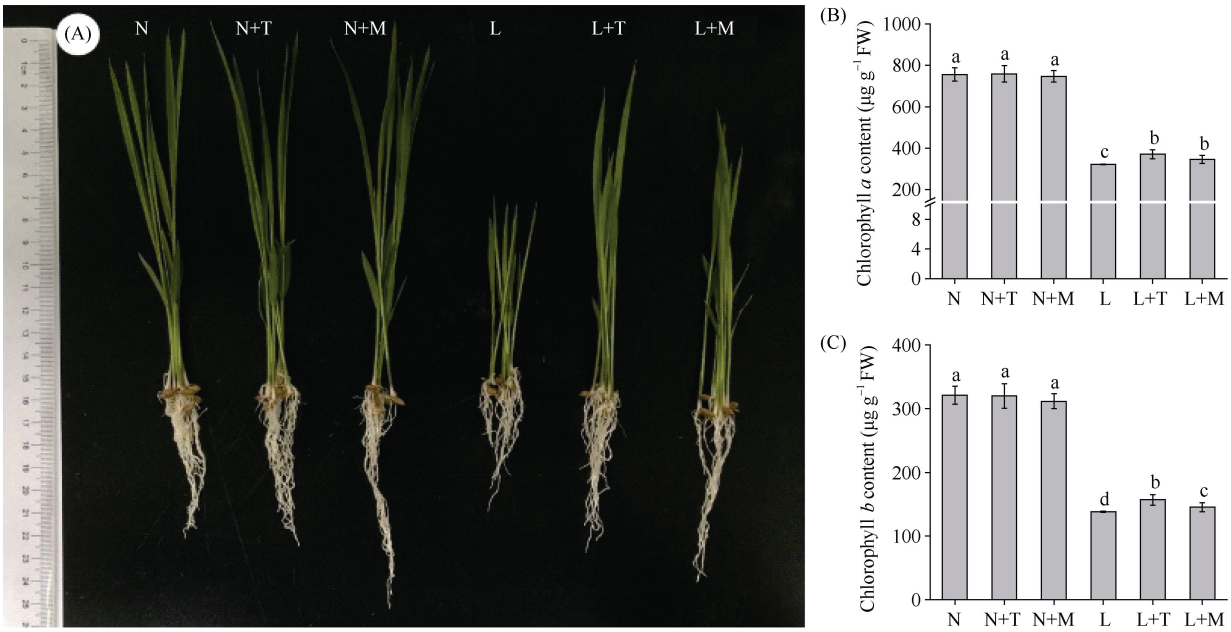


图 1 不同处理后水稻表型(A)、体内叶绿素 *a* (B)和叶绿素 *b* 含量(C)

Fig. 1 Rice phenotypic (A), chlorophyll *a* content (B), and chlorophyll *b* content (C) under different treatments

处理同表 1。不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

Treatments are the same as those given in Table 1. Columns with different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

2.3 褪黑素和茉莉酸甲酯对低温下水稻的养分吸收的影响

低温处理后水稻地上部 N、P、K 的含量分别为 27.35、5.29 和 41.91 g kg^{-1}, 比常温条件下相应养分的含量分别降低了 10.91%、26.93%和 17.53%, 说明低温抑制了水稻对育秧基质中养分的吸收。外源施加褪黑素后, 低温条件下的水稻地上部的 N、P、K 含量分别提高了 2.82%、18.15%和 7.95%, 施加茉莉酸甲酯后, 相应养分含量分别提高了 18.83%、8.70%和 15.63% (表 5), 说明褪黑素和茉莉酸甲酯促进了低温条件下水稻对外界养分的吸收。常温条件下, 外源施加褪黑素对水稻 N、P、K 的吸收没有显著影响, 外源施加茉莉酸甲酯后显著增加水稻对 K 的吸收, 水稻地上部的 K 含量约增加了 8.87% (表 5)。

2.4 褪黑素和茉莉酸甲酯对低温下水稻的抗氧化系统的影响

低温条件下, 水稻秧苗地上部的超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD), 过氧化氢酶(CAT), 谷胱甘肽转移酶(GST)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的酶活均显著增加, 分别增加了 13.93%、23.17%、132.90%、20.04%和 76.92% (表 6)。同时, 水稻体内的丙二醛和过氧化氢含量在低温条件下均显著上升, 分别增加了 206.71%和 60.16% (表 7), 说明低温条件下, 水稻启动体内抗氧化系统抵抗因低温胁迫产生的过氧化损伤。

表 5　不同温度处理后水稻植株养分含量
Table 5　Nutrient contents in rice under different temperature treatments

处理 Treatment	地上部氮含量 Shoot N content (g kg^{-1})	地上部磷含量 Shoot P content (g kg^{-1})	地上部钾含量 Shoot K content (g kg^{-1})
常温 N	30.70±2.26 ab	7.24±0.09 a	50.82±1.25 b
常温+褪黑素 N+T	30.41±1.86 ab	7.44±0.30 a	49.82±0.50 b
常温+茉莉酸甲酯 N+M	32.09±1.08 a	7.34±0.28 a	55.33±1.42 a
低温 L	27.35±0.28 c	5.29±0.12 d	41.91±1.22 d
低温+褪黑素 L+T	28.12±0.31 c	6.25±0.21 b	45.24±1.38 c
低温+茉莉酸甲酯 L+M	32.50±0.54 a	5.75±0.14 c	48.46±2.33 b

处理同表 1。同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。
Treatments are the same as those given in Table 1. Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

表 6　不同温度处理后水稻体内抗氧化酶活性
Table 6　Activity of anti-oxidase in rice under different temperature treatments

处理 Treatment	超氧化物歧化酶 SOD (U g^{-1} FW)	过氧化物酶 POD (U g^{-1} FW)	过氧化氢酶 CAT (nmol min^{-1} g^{-1} FW)	谷胱甘肽转移酶 GST (nmol min^{-1} g^{-1} FW)	抗坏血酸过氧化物酶 APX (μmol min^{-1} g^{-1} FW)
常温 N	19.82±0.56 e	5782.16±254.16 d	66.26±2.89 d	66.26±1.29 d	0.13±0.01 d
常温+褪黑素 N+T	21.40±0.33 d	6446.11±346.21 c	69.46±2.47 d	73.50±2.04 c	0.26±0.02 c
常温+茉莉酸甲酯 N+M	21.37±0.49 d	6370.06±155.78 c	106.12±5.44 c	80.80±2.67 b	0.34±0.01 b
低温 L	22.58±0.34 c	7122.18±264.79 b	154.32±10.10 b	79.54±5.09 b	0.23±0.02 c
低温+褪黑素 L+T	23.44±0.39 b	8713.56±405.39 a	161.34±6.72 b	94.29±3.06 a	0.32±0.01 b
低温+茉莉酸甲酯 L+M	24.51±0.41 a	9094.56±322.81 a	212.56±14.71 a	97.89±2.20 a	0.42±0.01 a

处理同表 1。同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。
Treatments are the same as those given in Table 1. Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

表 7　不同温度处理后水稻体内丙二醛和过氧化氢含量
Table 7　Contents of MDA and H_2O_2 in rice under different temperature treatments

处理 Treatment	丙二醛含量 MDA content (nmol g^{-1} FW)	过氧化氢含量 H_2O_2 content (μmol g^{-1} FW)
常温 N	7.45±0.31 c	9.89±0.69 c
常温+褪黑素 N+T	6.66±0.07 d	10.14±0.74 c
常温+茉莉酸甲酯 N+M	6.25±0.31 d	9.92±0.08 c
低温 L	22.85±2.72 a	15.84±0.85 a
低温+褪黑素 L+T	15.19±0.50 b	12.26±0.56 b
低温+茉莉酸甲酯 L+M	15.88±1.21 b	9.68±0.65 c

处理同表 1。同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。
Treatments are the same as those given in Table 1. Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

外源施加褪黑素后, 水稻体内的 SOD、POD、GST 和 APX 的活性均进一步增加, 比单纯低温胁迫分别增加了 3.81%、22.34%、18.54%和 39.13% (表 6), 同时, 水稻体内的丙二醛和过氧化氢含量比单纯低温胁迫分别减少了 33.52%和 13.85% (表 7)。外源施加茉莉酸甲酯后, 水稻体内的 SOD、POD、CAT、GST 和 APX 酶活性均显著增加, 相比较低温条件下, 分别增加了 8.55%、27.69%、37.74%、23.07%和 82.61% (表 6), 同时丙二醛和过氧化氢含量相比单纯低温胁迫分别减少了 30.50%和 38.89% (表 7)。说明在育秧基质中外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后, 2 种激素均可以通过调控水稻体内抗氧化系统中酶的活性, 降低水稻体内的过氧化氢含量, 从而缓解因低温胁迫带来的过氧化损伤。

2.5 褪黑素和茉莉酸甲酯对低温下水稻的渗透物质及其他激素含量的影响

常温条件下外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯对水稻体内的脯氨酸含量没有显著影响(图 2-A)。低温胁迫下，水稻体内的脯氨酸含量显著上升，提高了 33.90%，外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后，水稻体内的脯氨酸含量相较于单纯低温处理显著增加，分别增加了 33.24%和 53.46% (图 2-A)。低温处理显著增加水稻体内的可溶性蛋白含量，提高了 143.59%，但是外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后，可溶性蛋白含量并未进一步增加(图 2-B)，说明两者不能通过调控水稻体内可溶性蛋白的含量提高水稻耐低温胁迫能力。

低温胁迫显著增加水稻体内的脱落酸含量，其含量增加了 1848.39% (图 2-C)。然而，低温条件下外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后，水稻体内的脱落酸含量均显著下降，分别降低了 20.31%和 33.17% (图 2-C)。常温条件下，外源添加褪黑素显著降低了 GA_3 的含量，外源添加茉莉酸甲酯则增加了 GA_3 含量(图 2-D)，说明两者对 GA_3 存在不同的调控作用。低温处理显著降低水稻体内的 GA_3 含量，其含量降低了 21.54%，外源添加褪黑素后则进一步降低 GA_3 含量，降低了 33.33% (图 2-D)，然而添加茉莉酸甲酯显著增加 GA_3 的含量，可将其含量维持在常温条件下的正常水平(图 2-D)。

2.6 褪黑素和茉莉酸甲酯对低温下水稻冷胁迫相关基因表达的影响

测定水稻体内与耐冷胁迫相关的基因表达发现，低温条件下水稻体内的 *OsCold1* 基因表达量显著增加，然而施加褪黑素和茉莉酸甲酯后该基因表达并未进一步增加(图 3-A)，说明该基因不参与褪黑素和茉莉酸甲酯提高水稻耐冷胁迫。低温处理显著降低了水稻体内 *OsCDPK7* 基因的表达，外源添加褪黑素后该基因表达量虽然显著上升，但仍低于常温条件下的表达量，施用茉莉酸甲酯后该基因的表达量显著上升并高于常温条件下该基因的表达量(图 3-B)。低温处理提高了水稻体内 *OsFer1* 基因的表达，并且外源施加褪黑素该基因表达量进一步提高，而施加茉莉酸甲酯则抑制了该基因的表达量(图 3-C)。低温处理显著增加了水稻体内 *OsLti6b* 基因的表达，在施用褪黑素和茉莉酸甲酯后进一步提高了该基因的表达，并且褪黑素的作用更加明显(图 3-D)。低温处理提高了 *OsTrx23* 基因的表达量，外源施加褪黑素抑制该基因的表达，而茉莉酸甲酯则呈相反的作用，提高该基因的表达(图 3-E)。低温处理抑制了 *OsWRKY45* 基因的表达，外源施用褪黑素和茉莉酸甲酯后进一步抑制了该基因的表达，且褪黑素对该基因的抑制作用更加明显(图 3-F)。

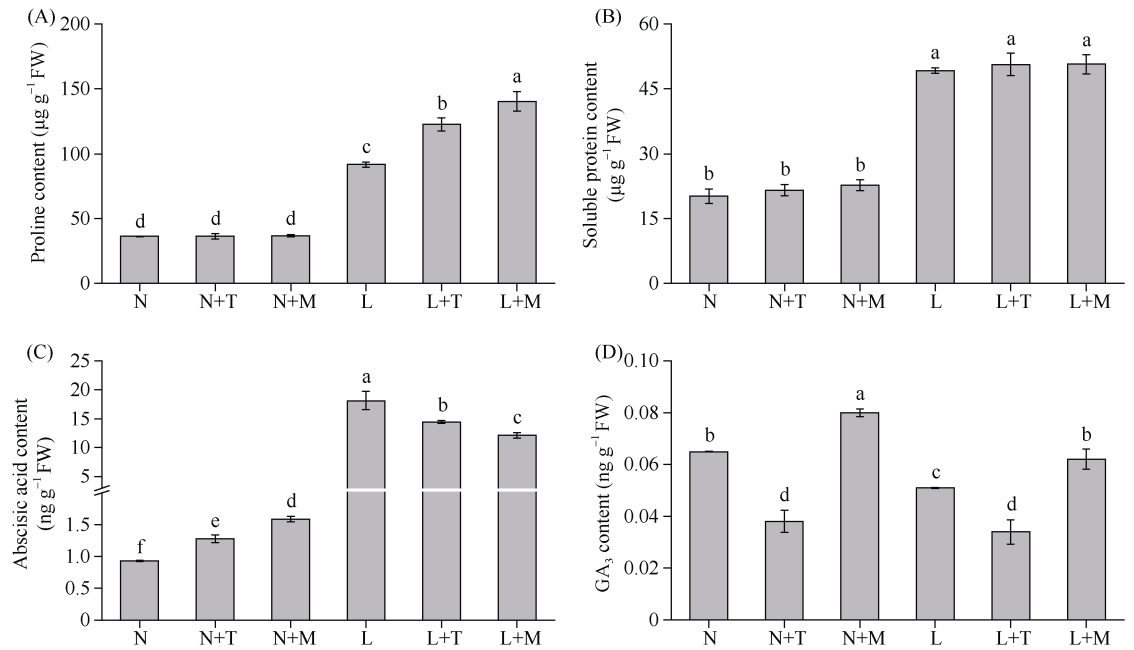


图 2 不同处理后水稻体内脯氨酸含量(A)、可溶性蛋白含量(B)、脱落酸含量(C)和 GA_3 含量(D)

Fig. 2 Proline content (A), soluble protein content (B), abscisic acid content (C), and GA_3 content (D) in rice under different treatments

处理同表 1。不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

Treatments are the same as those given in Table 1. Columns with different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

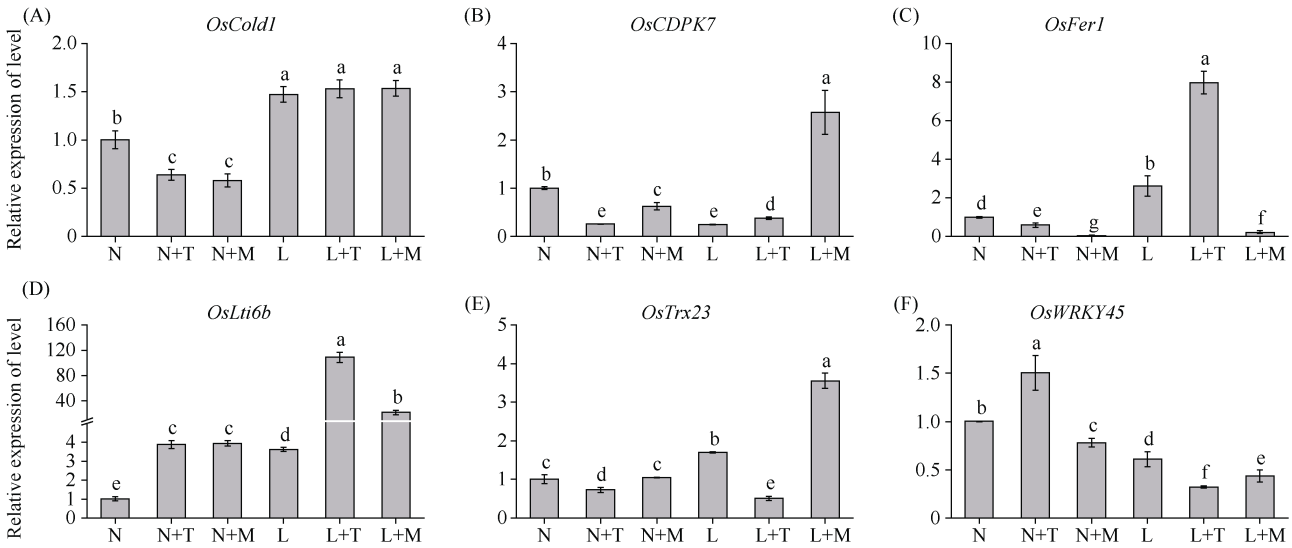


图 3　不同处理下水稻体内基因表达

Fig. 3　Relative expression patterns of relevant genes in rice under different treatments

处理同表 1。不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

Treatments are the same as those given in Table 1. Columns with different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

3　讨论

水稻的生长发育需要适宜的温度范围，其中水稻种子发芽的温度下限为 8℃ (耐寒品种除外)，苗期的最适生长温度为 25~30℃，水稻萌发期和秧苗期遭受低温胁迫会显著降低水稻发芽率、抑制水稻生长和减少其对养分的吸收，严重条件下甚至引起水稻秧苗死亡[23]。前期研究发现，茉莉酸甲酯和褪黑素均参与调控植物在低温条件下的萌发和秧苗生长，比如外源施加茉莉酸甲酯显著提高了水稻在低温胁迫下的发芽率和降低电解质渗透率，提高了黄瓜幼苗的干重和鲜重[24-25]；外源施加褪黑素显著提高大豆和杂交水稻的发芽率和发芽指数，提高了多年生黑麦草在低温胁迫后的鲜重[26-28]。在本实验中，单纯的低温处理显著降低了水稻的发芽率和发芽势，降低了水稻秧苗的株高、根长、叶龄、地上部干重、地下部干重、根条数和地上部的养分含量(表 3~表 5)，在基质中添加褪黑素和茉莉酸甲酯后，以上各项指标均显著增加，并且 2 种激素具有相同的效果(表 3~表 5)，说明褪黑素和茉莉酸甲酯均可缓解低温胁迫对水稻萌发和对水稻秧苗生长的抑制作用。

低温胁迫显著抑制水稻的光合速率，这与低温抑制叶绿素的合成密切相关[29]。叶绿素包括叶绿素 *a* 和叶绿素 *b*，主要功能为捕获光能并驱动电子转移，低温条件下，植物叶绿素含量的下降，不仅会导致光能吸收下降，抑制光合作用，还会抑制叶绿体的发育，从而使叶片出现黄化等症状，引起植物生长迟缓，甚至死亡[30]。在本实验中，低温胁迫 3 d 显著降低了水稻叶片中叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的含量，而在基质中添加褪黑素和茉莉酸甲酯均显著增加水稻叶片中的叶绿素含量(图 1)，暗示 2 种激素均可提高水稻幼苗在低温条件下叶绿素的合成，从而可能促使水稻维持较高的光合作用。

脯氨酸和可溶性蛋白是植物体内维持渗透平衡的物质，当植物遭受低温胁迫时会诱导脯氨酸和可溶性蛋白在植物体内积累，维持细胞渗透稳态，从而缓解低温胁迫[14]。前人的研究发现，外源添加褪黑素后，显著提高了烟草和大豆叶片中的脯氨酸含量和可溶性蛋白含量[26,31]；用茉莉酸甲酯对水稻种子做引发处理后，显著提高水稻体内的脯氨酸含量[32]。本实验中，低温胁迫显著增加水稻体内的脯氨酸和可溶性蛋白含量，外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后进一步增加水稻体内的脯氨酸的含量(图 2)，而可溶性蛋白含量没有进一步增加(图 2)，说明脯氨酸和茉莉酸甲酯通过调控脯氨酸的合成来缓解低温胁迫。

褪黑素和茉莉酸甲酯发挥调控作用时常与其他激素发生互相作用。脱落酸是植物体内常见抗逆激素，在低温胁迫下其含量显著增加，并且提高植物的抗寒能力[33]。然而，过量的脱落酸则会对植物生

长产生抑制作用[34]。前期研究发现，褪黑素处理会通过诱导脱落酸分解基因的表达或者抑制脱落酸合成基因的表达降低植物体内脱落酸含量，从而延缓植物衰老和抵抗逆境[35-36]。与前期研究一致，在低温胁迫下，水稻体内的脱落酸含量显著上升，外源施加褪黑素和茉莉酸甲酯后，水稻体内的脱落酸含量均显著下降(图 2)，说明褪黑素和茉莉酸甲酯均能显著抑制脱落酸的合成或者促进脱落酸的分解降低水稻体内的脱落酸含量。GA_3 参与调节植物的种子萌发、生长和果实发育[37]。本实验中，水稻体内的 GA_3 含量在低温条件下显著下降，外源添加褪黑素后进一步降低了 GA_3 的含量，而茉莉酸甲酯则提高低温条件下水稻体内的 GA_3 含量(图 2)，说明褪黑素和茉莉酸甲酯对 GA_3 存在不同的调控作用。虽然前人对抗冷性强的东乡野生稻和对低温敏感的 6225 两个籼稻品种研究发现，低温下东乡野生稻体内的 ABA 含量高于 6225，而 GA_3 的含量低于 6225，但其含量变化和 2 个水稻耐低温能力是否存在相关性还未明确[38]。介于植物体内激素互作调控网络的复杂性，本研究中褪黑素和茉莉酸调控 ABA 和 GA_3 含量变化与水稻耐低温能力的相关性需要进一步研究。

低温胁迫破坏植物体内活性氧代谢系统平衡，造成自由基过量积累，从而引起植物膜的过氧化损伤，破坏膜的完整性，影响植物正常生理代谢[39]。在正常情况下，植物自身会通过抗氧化物系统酶(如 SOD、POD、CAT、GST、APX 等)降低体内的过量活性氧，维持体内 ROS 平衡。其中 SOD 可将 O_2^- 转化为过氧化氢，APX、CAT、POD 等将过氧化氢或过氧化物转化为 H_2O 和 O_2，从而清除体内的 ROS[40]。谷胱甘肽-S-转移酶(GST)通过调控谷胱甘肽含量同样可以降低植物过氧化损伤[41]。前期研究发现，褪黑素和茉莉酸甲酯均参与调控植物体内的过氧化系统酶活性来缓解低温胁迫，比如，外源施加褪黑素后显著提高冷胁迫后杂交稻幼苗叶片中抗氧化酶 SOD、CAT 和 APX 的活性，降低 H_2O_2 和 MDA 含量[25]；外源施加 10 μmol L^{-1} 茉莉酸甲酯后显著提高水稻叶片中的 SOD，POD 和 CAT 活性，降低 MDA 含量[46]。本次实验中，低温条件下，水稻体内的 MDA 和 H_2O_2 含量均显著提高(表 6)，说明低温胁迫引起水稻体内过氧化损伤。外源添加褪黑素和茉莉酸甲酯后均显著提高水稻体内 SOD、POD、GST 和 APX 酶的活性(表 6)，从而通过降低植物体内 MDA 和 H_2O_2 含量缓解低温胁迫引起的过氧化损伤。除此之外，茉莉酸甲酯还单独通过提高 CAT 酶的活性调控体内 H_2O_2 含量(表 6)，缓解低温引起的过氧化损伤。以上结果说明，褪黑素和茉莉酸甲酯通过调控过氧化系统酶活性缓解水稻低温胁迫。

水稻耐冷是多基因控制的数量性状。前期的研究已经挖掘了不少与水稻耐冷胁迫相关的基因，比如 *OsCOLD1* 基因编码的蛋白与 G 蛋白 α 亚基互作激活钙离子通道感知冷胁迫和提高 GTP 酶活性缓解水稻的冷胁迫[42]；*OsCDPK7* 是水稻体内的与编码 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶(CDPK)有关的基因，当 *OsCDPK7* 基因过表达时，显著缓解水稻遭受的冷胁迫[43]；*OsFER1* 属于铁蛋白基因，在 *OsTERF2* 的下游调控水稻耐冷胁迫[44]；Os*Lti6b* 在水稻遭受冷胁迫时可以保护质膜在低温胁迫下的完整性[45]；*OsTrx23* 可以通过增强水稻的抗氧化系统提高水稻对低温的耐受性[46]；基因 *OsWRKY45* 负调控水稻的耐寒性，在低温条件下含有 *OsWRKY45* 基因的水稻的存活率要低于体内不含此基因的水稻[47]。本实验对以上 6 个基因的表达进行研究，发现 *OsCOLD1* 基因表达量虽然在低温胁迫下显著增加，但是不受褪黑素和茉莉酸甲酯调控(图 3-A)。茉莉酸甲酯在低温条件下上调 *OsCDPK7*、*OsLti6b*、*OsTrx23* 基因的表达和抑制 *OsWRKY45* 基因的表达参与调控水稻耐冷胁迫；而褪黑素则主要通过上调 *OsCDPK7*、*OsFER1*、*OsLti6b* 基因的表达和抑制 *OsWRKY45* 基因的表达参与调控水稻耐冷胁迫，说明茉莉酸甲酯和褪黑素在通过调控水稻体内耐冷基因表达缓解冷胁迫的过程中，既存在共性，也存在差异。

4 结论

育秧基质是保证水稻秧苗良好生长的关键因素，也是保障水稻移栽机械化顺利进行的前提因素。针对早稻育秧过程中容易遭受低温胁迫，抑制水稻秧苗生长，甚至引起秧苗大面积死亡的现象，我们利用在水稻育秧基质中外源添加茉莉酸甲酯和褪黑素 2 种激素，有效提高了水稻在低温条件下的萌发和促进了水稻在低温条件下的生长。2 种激素通过调节水稻体内抗氧化系统酶活性、渗透性物质含量、叶绿素含量、耐冷基因表达、ABA 和 GA_3 含量等方式缓解水稻的低温胁迫。本实验的顺利进行，可为后期通过在育秧基质中复配信号物质或者激素缓

解早稻育秧过程中低温损害提供研究思路和研究基础, 从而保障我国粮食生产安全。

References

[1] 刘勇, 张忠波, 刘雪. 低温对水稻产量的影响及防御措施. 中国新技术新产品, 2009, (12): 210.
Liu Y, Zhang Z B, Liu X. Effect of low temperature on rice yield and defense measurements. *China New Tech New Prod*, 2009, (12): 210 (in Chinese).

[2] 李海波, 侯守贵, 于广星, 王友芬, 陈盈, 王宁, 赵琦, 付亮, 张红艳, 邢亚南. 孕穗抽穗期低温对水稻植株、产量性状及脯氨酸含量的影响. 中国农学通报, 2011, 27(1): 63–68.
Li H B, Hou S G, Yu G X, Wang Y F, Chen Y, Wang N, Zhao Q, Fu L, Zhang H Y, Xing Y N. Effects of low temperature stresses on the characters of plant, yield and the proline contents in rice leaves at booting and heading stages. *Chin Agic Sci Bull*, 2011, 27(1): 63–68 (in Chinese with English abstract).

[3] 程式华. 2020 年中国水稻产业发展报告. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2020. p 173.
Cheng S H. China Rice Industry Development Report in 2020. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2020. p 173 (in Chinese).

[4] Tan D X, Hardeland R, Manchester L C. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot*, 2012, 63: 577–597.

[5] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *J Pineal Res*, 2012, 46: 58–63.

[6] Lobell D B, Sibley A, Ortiz-Monasterio J I. Extreme heat effects on wheat senescence in India. *Nat Clim Change*, 2012, 2: 186–189.

[7] Posmyk M M, Kuran H, Marciniak K, Janas K M. Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations. *J Pineal Res*, 2008, 45: 24–31.

[8] Schilmiller A L, Koo A J, Howe G A. Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol*, 2007, 143: 812–824.

[9] Wang Y, Xu H, Liu W, Nan W, Qu C, Jiang S, Fang H, Zhang Z, Chen X. Methyl jasmonate enhances apple' cold tolerance through the JAZ-MYC2 pathway. *Plant Cell*, 2018, 136: 75–84.

[10] Tian B H, Zhang Y J, Jin Z P, Liu Z Q, Pei Y X. Role of hydrogen sulfide in the methyl jasmonate response to cadmium stress in foxtail millet. *Front Biosci*, 2017, 22: 530–538.

[11] 刘华招. 水稻机插中苗育秧基质的研究. 现代化农业, 2009, (3): 1–3.
Liu H Z. Study on the substrate of rice seedling in mechanical transplanting. *Mod Agric*, 2009, (3): 1–3 (in Chinese).

[12] 毛羽, 张无敌. 无土栽培基质的研究进展. 农业与技术, 2001, 24(3): 83–88.
Mao Y, Zhang W D. Prospects of reseachers on soilless culture substrates. *Agric Tech*, 2001, 24(3): 83–88 (in Chinese with English abstract).

[13] 程晓娟, 罗春华, 支庚银, 姚海华, 王艳丽. 东北寒地粳稻烨霖无土基质育秧效果试验. 中国稻米, 2015, 21(4): 147–149.
Cheng X J, Luo C H, Zhi G Y, Yao H H, Wang Y L. Effects of yelin soilless substrate on seedling raising of *japonica* rice variety in cold region of northeast China. *China Rice*, 2015, 21(4): 147–149 (in Chinese with English abstract).

[14] 朱春权, 徐青山, 曹小闯, 朱练峰, 孔亚丽, 金千瑜, 张均华. 不同属性特征基质对早稻秧苗耐低温的影响. 中国水稻科学, 2021, 35: 503–512.
Zhu C Q, Xu Q S, Cao X C, Zhu L F, Kong Y L, Jin Q Y, Zhang J H. Effects of substrates with different properties on chilling tolerance of early rice seedlings. *Chin J Rice Sci*, 2021, 35: 503–512 (in Chinese with English abstract).

[15] 毕辛华, 戴心维. 种子学. 北京: 农业出版社, 1993. pp 60–61.
Bi X H, Dai X W. Seed Science. Beijing: Agriculture Press, 1993. pp 60–61 (in Chinese).

[16] 林育炯, 张均华, 胡继杰, 朱练峰, 曹小闯, 禹盛苗, 金千瑜. 不同类型基质对机插水稻秧苗生理特征及产量的影响. 农业工程学报, 2016, 32(8): 18–26.
Lin Y J, Zhang J H, Hu J J, Zhu L F, Cao X C, Yu S M, Jin Q Y. Effects of different seedling substrates on physiological characters and grain yield of mechanized-transplanted rice. *Trans CSAE*, 2016, 32(8): 18–26 (in Chinese with English abstract).

[17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 南京: 河海大学出版社, 2000. pp 308–315.
Lu R K. Methods of Soil Agricultural Chemical Analysis. Nanjing: Hehai University Press, 2000. pp 308–315 (in Chinese).

[18] 顾骏飞, 周振翔, 李志康, 戴琪星, 孔祥胜, 王志琴, 杨建昌. 水稻低叶绿素含量突变对光合作用及产量的影响. 作物学报, 2016, 42: 551–560.
Gu J F, Zhou Z X, Li Z K, Dai Q X, Kong X S, Wang Z Q, Yang J C. Effects of the mutant with low chlorophyll content on photosynthesis and yield in rice. *Acta Agron Sin*, 2016, 42: 551–560 (in Chinese with English abstract).

[19] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 867–880.

[20] Wang H H, Hou J J, Li Y, Zhang Y Y, Huang J J, Liang W H. Nitric oxide-mediated cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in aluminum toxicity of soybean under high aluminum concentration. *Plant Soil*, 2017, 416: 39–52.

[21] 周燮, 郑志富, 陈溥言, 章迪. 专一识别脱落酸甲酯的单克降抗体的制备与应用. 植物生理学报, 1969, 22(3): 284–290.
Zhou X, Zheng Z F, Chen B Y, Zhang D. Preparation and application of monoclonal antibodies specific for abscisic acid methyl ester. *Physiol Mol Biol Plants*, 1969, 22(3): 284–290 (in Chinese with English abstract).

[22] 郑志富, 周燮. 识别未衍生化的 13-羟化 Gas 及其葡萄糖苷的单克隆抗体. 植物学报, 1995, 37: 761–769.
Zheng Z F, Zhou X. A monoclonal antibody recognizing nonderivative 13-hydoxy gibberellins and their glucosides. *Acta Bot Sin*, 1995, 37: 761–769 (in Chinese with English abstract).

[23] 余保生, 王万福, 谢保忠. 极端温度对水稻生产的影响. 现代农业科技, 2010, (24): 92.
Yu B S, Wang W F, Xie B Z. Effect of extreme temperature on rice production. *Mod Agric Sci Tech*, 2010, (24): 92.

[24] 段小华, 邓泽元, 宾金华. 茉莉酸甲酯对水稻幼苗抗冷性的影

响. 植物生理学通讯, 2009, 45: 881–884.
Duan X H, Deng Z Y, Bin J H. Effects of methyl jasmonate on cold resistance of rice (*Oryza sativa* L.) seedling. *Plant Physiol J*, 2009, 45: 881–884 (in Chinese with English abstract).

[25] 王蕾. 茉莉酸甲酯和冠菌素对黄瓜幼苗抗冷性的影响. 中国农业大学硕士学位论文, 北京, 2006.
Wang L. Effects of Methyl Jasmonate and Coronatine on Chilling Tolerance of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Seedling. MS Thesis of China Agricultural University, Beijing, China, 2006 (in Chinese with English abstract).

[26] 于奇, 曹亮, 金喜军, 邹京南, 王孟雪, 张明聪, 任春元, 张玉先. 低温胁迫下褪黑素对大豆种子萌发的影响. 大豆科学, 2019, 38: 56–62.
Yu Q, Cao L, Jin X J, Zou J N, Wang M X, Zhang M C, Ren C Y, Zhang Y X. Effects of melatonin on seed germination of soybean under low temperature stress. *Soybean Sci*, 2019, 38: 56–62 (in Chinese with English abstract).

[27] 董倩. N-乙酰-L-半胱氨酸、褪黑素引发对低温胁迫下杂交水稻种子萌发和幼苗生长及基因表达的影响. 浙江大学硕士学位论文, 浙江杭州, 2020.
Dong Q. Effects of Seed Priming by N-acetyl-L-cysteine and Melatonin on Seed Germination, Seedling Growth and Gene Expression of Hybrid Rice under Low Temperature. MS Thesis of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China, 2020 (in Chinese with English abstract).

[28] 尉欣荣, 张智伟, 周雨, 刘鹏, 姚宏斌, 苗彦军, 付娟娟. 褪黑素对低温和干旱胁迫下多年生黑麦草幼苗生长和抗氧化系统的调节作用. 草地学报, 2020, 28(5): 169–177.
Wei X R, Zhang Z W, Zhou Y, Liu P, Yao H B, Miao Y J, Fu J J. Effects of melatonin on growth and antioxidant system of perennial ryegrass seedlings under cold and drought stresses. *Acta Agrestia Sin*, 2020, 28(5): 169–177 (in Chinese with English abstract).

[29] 王国莉, 郭振飞. 低温对水稻不同耐冷品种幼苗光合速率和叶绿素荧光参数的影响. 中国水稻科学, 2005, 19: 381–383.
Wang G L, Guo Z F. Effects of chilling stress on photosynthetic rate and the parameters of chlorophyll fluorescence in two rice varieties differing in sensitivity. *Chin J Rice Sci*, 2005, 19: 381–383 (in Chinese with English abstract).

[30] Ki-Hong J, Junghe H, Choong-Hwan R, Youngju C, Yong-Yoon C, Akio M, Hirohiko H, An G. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the t-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 463–472.

[31] 张嘉雯, 卢绍浩, 赵喆, 赵铭钦. 外源褪黑素对低温胁迫下烟草幼苗生理指标的影响. 中国农业科技导报, 2020, 22(9): 78–86.
Zhang J W, Lu S H, Zhao Z, Zhao M Q. Influences of exogenous melatonin on physiological properties of tobacco seedlings under low temperature stress. *J Agric Sci Tech*, 2020, 22(9): 78–86 (in Chinese with English abstract).

[32] Salah M. 引发和冷等离子体处理通过生理、分子及代谢调控提高水稻种子的抗逆性. 浙江大学博士学位论文, 浙江杭州, 2017.
Salah M. Physiological, Molecular and Metabolic Effects of Priming and Cold Plasma Treatment on Rice Seeds to Improve Resistance to Different Abiotic Stresses. PhD Dissertation of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China, 2017 (in Chinese with English abstract).

[33] 罗立津, 徐福乐, 翁华钦, 洪淑珠, 段留生, 李召虎. 脱落酸对甜椒幼苗抗寒性的诱导效应及其机理研究. 西北植物学报, 2011, 31: 94–100.
Luo L J, Xu F L, Wong H Q, Hong S Z, Duan L S, Li Z H. Inducing effects and its biological mechanisms of ABA on the chilling resistance of sweet pepper seedlings. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2011, 31: 94–100 (in Chinese with English abstract).

[34] 郭栋梁, 王静杰, 万小荣, 李玲. 外源脱落酸抑制花生种子发芽的生理机制. 植物生理学报, 2008, 44: 936–938.
Guo D L, Wang J J, Wan X R, Li L. Physiological mechanism of the suppression of peanut seed germination by exogenous ABA. *Plant Physiol J*, 2008, 44: 936–938 (in Chinese with English abstract).

[35] Zhang J, Shi Y, Zhang X, Du H, Xu B, Huang B. Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environ Exp Bot*, 2017, 138: 36–45.

[36] Zhang H J, Zhang N, Yang R C, Wang L, Sun Q Q, Li D B, Cao Y Y, Weeda S, Zhao B, Ren S. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA_4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Pineal Res*, 2014, 57: 269–279.

[37] 庄维兵, 刘天宇, 束小春, 渠慎春, 王涛, 张凤娇, 王忠. 褪黑素在植物生长发育过程中与植物激素的关系. 安徽农业科学, 2018, 46(31): 18–22.
Zhuang W B, Liu T Y, Shu X C, Qu S C, Wang T, Zhang F J, Wang Z. Relationship between melatonin and plant hormones during plant growth and development. *J Anhui Agric Sci*, 2018, 46(31): 18–22 (in Chinese with English abstract).

[38] 黄涛, 陈大洲, 夏凯, 周燮. 抗冷与不抗冷水稻在低温期间叶片 ABA 与 GA1 水平变化的差异. 华北农学报, 1998, 13(4): 56–60.
Huang T, Chen D Z, Xia K, Zhou X. Differential response of ABA and GA_1 levels between chilling-resistant and chilling-sensitive varieties of rice during chilling stress. *Acta Agric Boreali-Sin*, 1998, 13(4): 56–60 (in Chinese with English abstract).

[39] Murata N, Los D A. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol*, 1997, 115: 875–879.

[40] 祝涛, 杨美英. 低温处理对不同品种水稻苗期保护酶活性的影响. 吉林农业, 2010, (7): 95.
Zhu T, Yang M Y. Effects of low temperature treatment on activities of protective enzymes in different rice varieties at seedling stage. *Agric Jilin*, 2010, (7): 95 (in Chinese).

[41] You J, Chan Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1–15.

[42] Ma Y, Dai X Y, Xu Y Y, Luo W, Zheng X M, Zeng D, Pan Y J, Lin X L, Liu H H, Zhang D J, Xiao J, Guo X Y, Xu S J, Niu Y D, Jin J B, Zhang H, Xu X, Li L G, Wang W, Qian Q, Ge S, Chong K. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 2015, 6: 1209–1221.

[43] Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K. Overexpression of a single Ca^{2+}-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 2000, 23:

319–327.

[44] Tian Y, Zhang H W, Pan X W, Chen Z J, Zhang Z J, Lu X Y, Huang R F. Overexpression of ethylene response factor *TERF2* confers cold tolerance in rice seedlings. *Trans Res*, 2011, 20: 857–866.

[45] Morsy M R, Almutairi A M, Gibbons J, Yun S J, Benildo G. The *OsLti6* genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene*, 2005, 344: 171–180.

[46] Xie G, Kato H, Sasaki K, Imai R. A cold-induced thioredoxinh of rice, *OsTrx23*, negatively regulates kinase activities of *OsMPK3* and *OsMPK6 in vitro*. *FEBS Lett*, 2009, 583: 2734–2738.

[47] Tao Z, Kou Y, Liu H, Li X, Xiao J, Wang S. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *J Exp Bot*, 2011, 62: 4863–4874.