

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2023.01.019

徐青山, 张均华, 魏倩倩, 等. 乙烯通过调控氧化还原水平和耐冷基因表达提高早稻秧苗耐低温胁迫能力. 土壤, 2023, 55(1): 153–160.

乙烯通过调控氧化还原水平和耐冷基因表达提高早稻秧苗耐低温胁迫能力^①

徐青山¹, 张均华¹, 魏倩倩^{1,2}, 孔亚丽¹, 潘林^{1,3}, 黄晶¹, 曹小闯¹, 朱练峰¹, 田文昊¹, 金千瑜¹, 朱春权^{1*}

(1 中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006; 2 安徽大学资源与环境工程学院, 合肥 230039; 3 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江牡丹江 157000)

摘要: 乙烯参与调控植物响应多种逆境胁迫, 然而乙烯调控早稻秧苗响应低温胁迫的生理和分子机制还不明确。本研究选择无土基质、发酵基质和营养土 3 种育秧基质对中早 39 早稻品种进行正常育秧至两叶一心期, 外源喷施乙烯利后将水稻秧苗进行 3 d 的低温处理, 随后测定秧苗理化性质和抗寒基因表达, 同时以喷施等量清水作为对照。结果显示: 喷施乙烯利后显著提高了低温条件下水稻秧苗的生长, 提高了秧苗体内的养分含量和渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖含量, 增强了秧苗体内抗氧化系统酶活性和氧化还原状态 (AsA/DHA 比率), 提高了秧苗体内 *OsCOIN*、*TERF2*、*OsLti6a* 和 *OsCDPK7* 等耐冷基因的表达。以上结果说明, 外源喷施乙烯通过调控水稻体内渗透调节物质含量、氧化还原水平和耐冷基因的表达增强水稻秧苗的耐低温胁迫能力。

关键词: 乙烯; 基质; 水稻; 低温; 基因; 抗氧化酶

中图分类号: S184 文献标志码: A

Ethylene Improves Low Temperature Tolerance of Early Rice Seedlings by Regulating REDOX Level and Cold Tolerance Gene Expression

XU Qingshan¹, ZHANG Junhua¹, WEI Qianqian^{1,2}, KONG Yali¹, PAN Lin^{1,3}, HUANG Jing¹, CAO Xiaochuang¹, ZHU Lianfeng¹, TIAN Wenhao¹, JIN Qianyu¹, ZHU Chunquan^{1*}

(1 State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 2 School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230039; 3 College of Life Sciences and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157000, China)

Abstract: Ethylene is involved in regulating plant response to multiple stress. However, the physiological and molecular mechanisms by which ethylene regulates the response of early rice seedlings to low temperature stress remain unclear. In this study, three substrates including soilless substrate, fermentation substrate and nutritional soil were selected for raising early rice Zhongzao39 to the two-leaf stage. After being sprayed ethephon, rice seedlings were treated with low temperature for 3 days, and then the physiochemical properties and the expression of cold resistance genes were determined. Equal amount of water was sprayed as control. The results show that ethephon treatment significantly increases the growth of rice seedlings at low temperature, increases the contents of nutrients and osmotic regulation substances proline and soluble sugar, and enhances the antioxidant system enzyme activities and REDOX status (AsA/DHA ratio) of rice seedlings. The expression of cold tolerance genes such as *OsCOIN*, *TERF2*, *OsLti6a* and *OsCDPK7* in seedlings are improved. These results suggest that ethylene spraying can enhance the resistance of rice seedlings to low temperature stress by regulating the content of osmotic substances, REDOX level and expression of cold tolerance genes in rice.

Key words: Ethylene; Substrate; Rice; Low temperature; Gene; Antioxidant enzyme

①基金项目: 国家自然科学基金项目(31901452, 31872857)和浙江省重点研发计划项目(2021C02063-3) 资助。

* 通讯作者(zhuchunquan@caas.cn)

作者简介: 徐青山(1998—), 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向为水稻逆境生理。E-mail: 1743786166@qq.com

水稻是我国播种面积最大的粮食作物。据国家统计局数据显示,2020 年我国水稻播种面积为 3 006.67 万 hm^2 , 比上年增加 38.2 万 hm^2 , 增长 1.3%。在水稻育秧期间,当温度持续低于 12℃时,将严重影响水稻秧苗质量,限制水稻在大田期间的生长发育,降低水稻产量^[1]。随着气候变暖,双季稻和早稻的播种面积将持续增长,但极端低温天气的发生也愈加频繁。因此,寻求有效的外源调控措施,增强水稻育秧期间的低温抗性,对保障我国早稻安全生产有着重要意义。

乙烯是一种气体类激素,并参与调控植物响应逆境胁迫。植物体内,蛋氨酸在三磷酸腺苷 (ATP)参与下生成 S-腺苷蛋氨酸 (SAM),而后通过 1-氨基环丙烷羧酸 (ACC)合成酶催化形成 ACC,最后通过 ACC 氧化酶 (ACO)催化生成乙烯。乙烯不仅在植物种子萌发、器官衰老和果实成熟脱落等生理过程中起重要作用^[2],还参与调控植物响应高温胁迫^[3]、水淹胁迫^[4]、盐胁迫^[5]、干旱胁迫^[6]以及重金属胁迫^[7]等非生物胁迫。然而,目前乙烯调控水稻秧苗响应低温胁迫的研究却鲜有报道。

水稻主要分为直播和移栽两种种植方式,我国以移栽为主。良好的秧苗素质是移栽后水稻秧苗迅速恢

复和存活的关键。传统水稻育秧主要以营养土为主,但存在取土难、养分含量低和破坏生态环境等问题。相对于营养土,本课题组自主研发的无土基质和发酵基质具有养分含量高、稳定性强等众多优点,同时前期研究发现,该无土基质和发酵基质育成的水稻秧苗更耐冷^[8]。本研究将运用营养土和这两种自制的育秧基质对早稻品种中早 39 进行育秧,并在两叶一心期时外源喷施乙烯利,然后进行为期 3 d 的低温胁迫,通过测定水稻秧苗的生化指标和基因表达,以阐明在不同育秧基质中乙烯调控水稻响应低温胁迫的生理和分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验设计

供试材料为籼型常规早稻“中早 39”,由中国水稻研究所选育而成。利用植物生长调节剂乙烯利(购自阿拉丁试剂有限公司, HPLC>90%)作为乙烯借体,其喷施到水稻叶片上后会释放出乙烯。本试验选用七寸秧盘进行育秧试验,育秧基质选择常规营养土、自制的无土基质和发酵基质。3 种基质的基本理化性质见表 1。

表 1 育秧基物理化性质
Table 1 Physiochemical properties of seedling substrates

基质类型	pH	电导率 (mS/cm)	容重(g/cm^3)	阳离子交换量(cmol/kg)	全氮(g/kg)
无土基质	6.70 ± 0.04 b	2.71 ± 91.92 b	0.18 ± 0.01 c	11.19 ± 0.31 b	4.38 ± 0.41 b
发酵基质	7.09 ± 0.05 a	3.12 ± 251.59 a	0.60 ± 0.01 b	20.31 ± 2.01 a	8.99 ± 0.83 a
营养土	6.92 ± 0.23 ab	0.12 ± 4.59 c	0.90 ± 0.01 a	7.73 ± 0.73 c	0.97 ± 0.09 c
基质类型	全磷(g/kg)	全钾(g/kg)	碱解氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)
无土基质	3.09 ± 0.11 b	5.41 ± 0.02 c	835.53 ± 7.95 a	350.15 ± 20.67 a	1 490.30 ± 9.72 b
发酵基质	7.66 ± 0.24 a	9.45 ± 0.07 a	640.03 ± 10.11 b	285.16 ± 3.23 b	2 639.64 ± 14.73 a
营养土	1.59 ± 0.07 c	7.79 ± 0.47 b	154.44 ± 1.81 c	70.89 ± 3.18 c	97.29 ± 0.08 c

注:表中同列不同小写字母表示各基质间差异显著($P<0.05$)。

将水稻种子催芽露白,每个秧盘播撒 90 g 种子。于 2021 年 4 月 7 日播种,秧盘放置于温室大棚中正常育秧至两叶一心,然后每盘分别喷施 100 mL 1.5 g/L 的乙烯利或等量清水,随后将秧盘放入人工气候室进行低温培养(白天 15℃,晚上 10℃)3 d。不同试验处理见表 2,每个试验处理 3 个重复。

1.2 秧苗素质与养分测定

在低温处理后,每个秧盘分别随机取 20 株秧苗测定株高、根长、叶龄、根数、茎基宽、百株地上干重、百株地下干重。同时取秧苗进行烘干,烘干后的样品研磨后称取 0.1 g,用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 进行消煮,

随后分别采用凯氏定氮法、钼锑抗比色法和火焰光度计法测定全氮、全磷和全钾含量^[9]。

表 2 试验设计方案
Table 2 Scheme of experimental design

处理	基质类型	施加激素
A1	无土基质	100 mL 清水
A2	无土基质	100 mL 1.5 g/L 乙烯利
B1	发酵基质	100 mL 清水
B2	发酵基质	100 mL 1.5 g/L 乙烯利
C1	营养土	100 mL 清水
C2	营养土	100 mL 1.5 g/L 乙烯利

1.3 水稻生理指标的测定

采取低温处理后的秧苗，通过液氮研磨后，在冰上进行相关生理指标的测定。其中，可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法^[10]；脯氨酸含量的测定采用茚三酮法^[11]；丙二醛 (MDA)、过氧化氢(H₂O₂)、脱氢抗坏血酸(DHA)、还原型抗坏血酸(AsA)含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、谷胱甘肽转移酶 (GST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)和抗坏血酸过氧化物酶 (APX)活性均采用苏州科铭生物技术有限公司的检测试剂盒进行测定。

1.4 水稻耐冷基因表达测定

水稻新鲜叶片剪下后立即用液氮进行研磨,加入

TRizol 后提取叶片总 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 (PrimeScript 反转录试剂盒，TaKaRa，日本)，运用 Sybgreen (TaKaRa，日本)进行实时荧光定量 PCR，所选基因的引物和内参基因引物见表 3；测定后以 *OsHistone* 作为内参基因，以低温条件下不添加乙烯利的处理组作为对照。

1.5 数据处理与统计分析

试验数据采用 SAS9.2 软件进行统计分析 (单因素方差分析)，均数采用 Tukey 法检验统计学差异。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。

表 3 水稻引物序列
Table 3 The sequence of primers in rice

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>COLD1</i>	CAGGATATCAAAAGCTTGGATG	GCAGCTATCTTTGCTTGACG
<i>OsICE1</i>	ATGAGAATCTTCGGCAAGGA	CGTGGAACACCCTGGAGAT
<i>OsCOIN</i>	ATGAGCTCTCTATGCCCTTTGCCA	CTTGTCATCCAATTGTTTTGTAGA
<i>OsCDPK7</i>	GAGGAAATCGCTGGGTGA	TTCTCATTGTTCTTCGTCCGA
<i>TERF2</i>	TTGTCATCCACCGACCTATG	TCACCATCTCCTCTCCTCC
<i>OsLti6a</i>	GCTGTCTGGGTCATACCAAG	ACAGGGACGAGAAGGTGCAG
<i>OsHistone</i>	GGTCAACTTGTTGATTCCCCTCT	AACCGCAAAATCCAAAGAACG

2 结果与分析

2.1 水稻秧苗生长

低温处理后，喷施乙烯利使无土基质育成秧苗的株高、叶龄和根数较其相应对照(A1)增加了 11.24%、11.51% 和 13.89%，发酵基质育成秧苗的株高和根数较其相应对照(B1)增加了 12.44% 和 31.84%，营养土育成秧苗的株高、叶龄和根数较其相应对照(C1)分别

增加了 9.74%、25.44% 和 23.26% (表 4)。与对照相比，营养土中喷施乙烯利的秧苗的茎基宽显著增加 17.18%。然而，各基质中乙烯利处理却显著降低了水稻的根系长度 (表 4)。

不同基质之间育成的水稻秧苗在低温条件下同样存在差异。喷施乙烯利后，无土基质育成秧苗的叶龄比营养土育成的秧苗高 12.95%，发酵基质育成秧苗的根长较营养土育成的秧苗高 25.60% (表 4)。

表 4 低温条件下不同处理后水稻秧苗生长指标
Table 4 Growth parameters of rice seedlings under different treatments at low temperatures

处理	株高 (cm)	根长 (cm)	叶龄 (d)	根数	茎基宽 (cm/10 株)	地下部干重 (g/100 株)	地上部干重 (g/100 株)
A1	11.89 ± 0.11 c	8.41 ± 0.48 bc	2.16 ± 0.16 b	7.20 ± 0.21 b	1.68 ± 0.10 b	0.61 ± 0.01 a	1.43 ± 0.20 a
A2	13.22 ± 0.39 b	4.50 ± 1.30 d	2.41 ± 0.07 a	8.20 ± 0.35 a	1.75 ± 0.08 b	0.29 ± 0.02 c	1.43 ± 0.08 a
B1	11.56 ± 0.96 c	11.10 ± 0.46 a	1.97 ± 0.01 c	6.38 ± 0.38 c	1.68 ± 0.02 b	0.54 ± 0.04 ab	1.12 ± 0.09 b
B2	12.99 ± 0.27 b	9.26 ± 0.36 b	2.07 ± 0.02 bc	8.41 ± 0.75 a	1.75 ± 0.05 b	0.48 ± 0.03 b	1.14 ± 0.08 b
C1	13.45 ± 0.18 b	9.64 ± 0.28 b	1.71 ± 0.05 d	6.98 ± 0.12 bc	1.63 ± 0.07 b	0.50 ± 0.00 b	1.40 ± 0.08 a
C2	14.76 ± 0.26 a	7.37 ± 0.39 c	2.15 ± 0.08 b	8.60 ± 0.11 a	1.91 ± 0.07 a	0.48 ± 0.07 b	1.40 ± 0.10 a

注：处理中的 A、B、C 分别表示无土基质、发酵基质、营养土，1、2 分别表示清水处理、乙烯利处理；表中不同字母表示处理间均值在 $P<0.05$ 水平差异显著；下同。

2.2 水稻秧苗养分含量

外源喷施乙烯利提高低温条件下水稻体内养分含量,其中发酵基质和营养土育成的水稻秧苗全氮含量分别较其相应对照高 25.96% 和 28.72%;无土基质和发酵基质育成秧苗的全磷含量分别较其对照高 23.75% 和 64.78%,而营养土育成秧苗的全磷含量与其对照相比没有显著差异;发酵基质育成的秧苗体内全钾含量较其对照高 43.05% (表 5)。

表 5 低温条件下不同处理后水稻秧苗养分含量
Table 5 Nutrient contents of rice seedlings under different treatments at low temperatures

处理	全氮含量 (g/kg)	全磷含量 (g/kg)	全钾含量 (g/kg)
A1	14.40 ± 0.63 b	3.68 ± 0.27 b	7.87 ± 0.09 b
A2	14.40 ± 0.29 b	4.56 ± 0.46 a	7.78 ± 0.05 b
B1	15.00 ± 0.66 b	2.71 ± 0.28 c	7.34 ± 0.16 cd
B2	18.90 ± 0.46 a	4.47 ± 0.43 a	10.5 ± 0.34 a
C1	11.20 ± 0.60 c	2.64 ± 0.26 c	7.11 ± 0.07 cd
C2	14.50 ± 0.51 b	3.28 ± 0.54 bc	6.86 ± 0.04 d

外源喷施乙烯利后,无土基质育成的秧苗体内全磷和全钾含量较营养土育成的秧苗高 38.97% 和 13.31%;发酵基质育成的秧苗与营养土育成的秧苗相比,其全氮、全磷和全钾含量分别高 30.89%、36.37%

和 50.05% (表 5)。

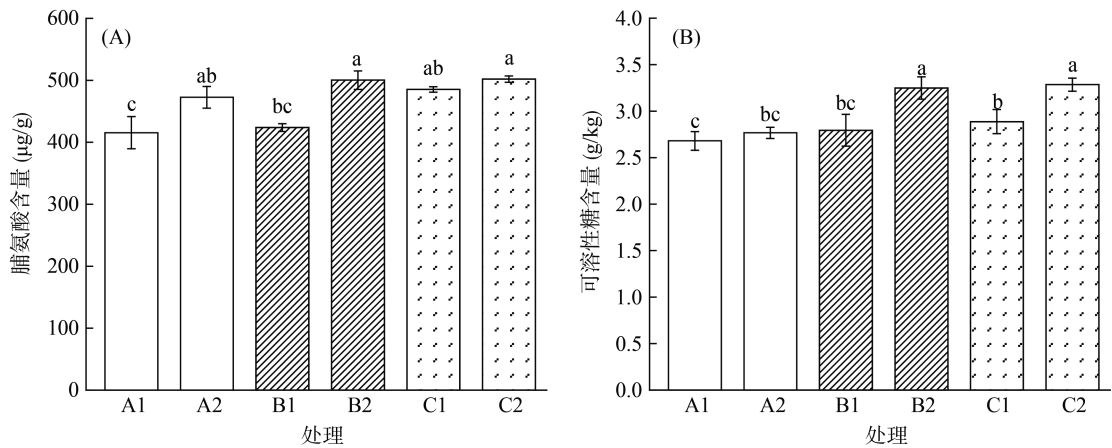
2.3 水稻秧苗渗透调节物质含量

低温处理下喷施乙烯利显著提高无土基质和发酵基质育成秧苗体内的脯氨酸含量,分别比相应对照高 13.72% 和 18.03% (图 1A)。低温处理下喷施乙烯利使发酵基质和营养土育成秧苗体内的可溶性糖含量分别比相应对照高 16.24% 和 13.73% (图 1B)。

2.4 水稻秧苗过氧化氢、脱氢抗坏血酸和还原型抗坏血酸含量

低温条件下,外源喷施乙烯利显著降低发酵基质和营养土育成秧苗体内的过氧化氢(H₂O₂)含量,分别降低了 18.75% 和 19.37% (图 2C)。乙烯利处理显著增加了水稻体内的还原型抗坏血酸(AsA)含量和降低了脱氢抗坏血酸(DHA)含量,从而提高了 AsA/DHA 比率,无土基质、发酵基质和营养土 3 种基质育成秧苗体内的 AsA/DHA 比率分别比相应对照高 80.31%、48.13% 和 36.79% (图 2D)。

低温处理下,无土基质和发酵基质育成秧苗体内的 H₂O₂ 含量显著低于营养土育成的秧苗。喷施乙烯利后,无土基质和发酵基质育成秧苗的 AsA 含量和 DHA 含量均显著高于营养土育成的秧苗,而 AsA/DHA 比率则相反。



(图中不同小写字母代表处理间差异在 $P<0.05$ 水平上显著,下同)
图 1 不同处理下水稻地上部脯氨酸含量(A)和可溶性糖含量(B)
Fig. 1 Contents of proline (A) and soluble sugar (B) in rice shoots under different treatments

2.5 水稻秧苗抗氧化酶活性

低温处理下,外源施加乙烯利使无土基质中水稻体内的 POD 和 GST 活性分别增加了 51.80% 和 19.04%;发酵基质中水稻体内的 POD、SOD、GST、GPX 和 APX 活性分别增加了 23.51%、9.30%、30.70%、24.01%和 20.80%;营养土中水稻体内的 POD、SOD、GST 和 APX 活性分别增加了 92.32%、

10.50%、19.60% 和 44.84% (表 6)。

低温处理下,无土基质和发酵基质育成的水稻秧苗的 POD、APX 和 GPX 活性比营养土育成的水稻秧苗要显著增加 9.02%~40.65%;喷施乙烯利后,无土基质育成的水稻秧苗 GPX 活性比营养土育成的水稻秧苗要显著增加 14.23%,发酵基质育成的水稻秧苗 GST 活性比营养土育成的水稻秧苗要显著增加 44.37% (表 6)。

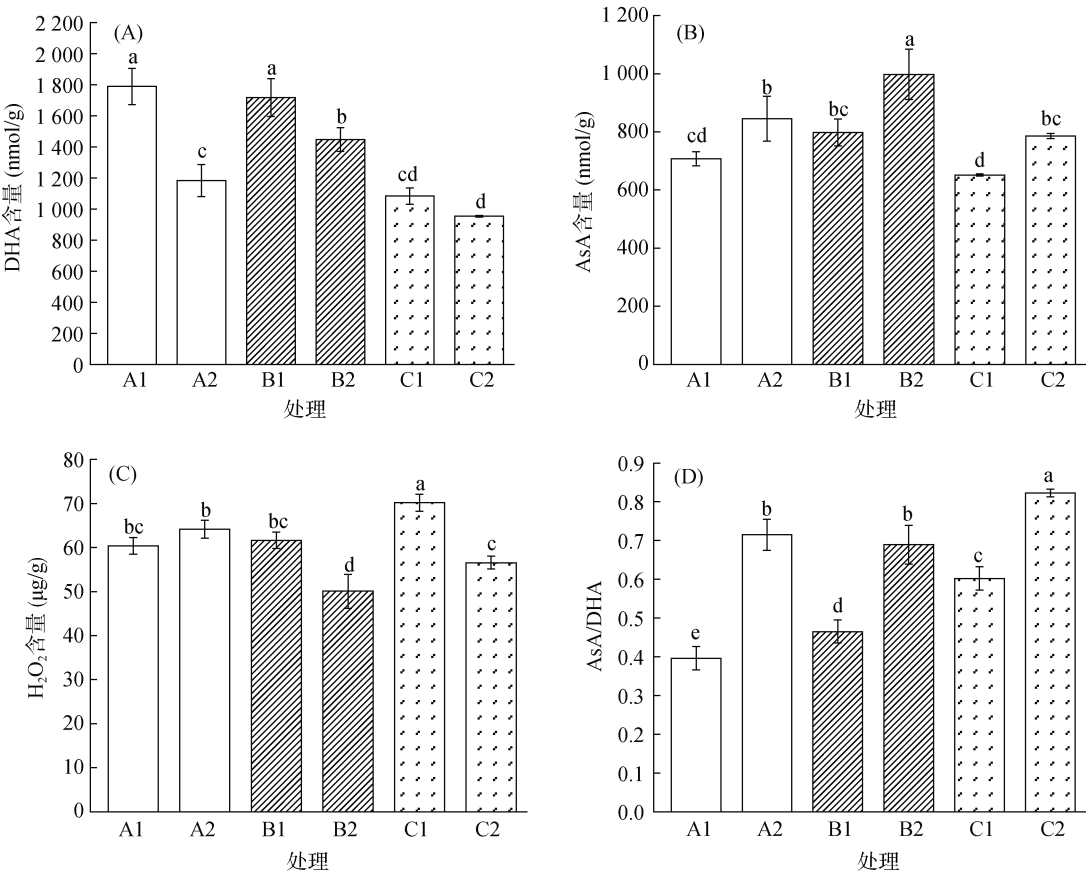


图 2 低温条件下乙烯利处理后水稻秧苗 H₂O₂、AsA 和 DHA 含量及 AsA/DHA
Fig. 2 Contents of H₂O₂, AsA and DHA and AsA/DHA in rice seedlings treated with Etheaura at low temperature

表 6 低温条件下不同处理后水稻秧苗抗氧化酶活性
Table 6 Activities of antioxidant enzymes in rice seedlings under different treatments at low temperature

处理	POD (U/g)	SOD (U/g)	CAT (nmol/(min·g))	GST (nmol/(min·g))	GPX (nmol/(min·g))	APX (nmol/(min·g))
A1	971.92 ± 34.62 d	1397.46 ± 6.38 c	62.74 ± 4.34 b	142.60 ± 9.85 cd	879.11 ± 47.58 cd	10.38 ± 0.59 cd
A2	1475.36 ± 20.64 b	1413.18 ± 35.43 bc	62.10 ± 3.85 b	169.75 ± 2.46 b	894.25 ± 37.99 bc	12.56 ± 0.94 abc
B1	1003.14 ± 91.65 d	1423.85 ± 56.41 bc	61.63 ± 1.85 b	172.82 ± 7.13 b	993.50 ± 43.35 b	10.81 ± 0.54 bcd
B2	1238.97 ± 33.43 c	1556.32 ± 20.61 a	53.43 ± 6.43 c	225.88 ± 21.15 a	1232.02 ± 98.72 a	13.06 ± 0.91 a
C1	836.38 ± 38.24 e	1362.67 ± 68.27 c	70.17 ± 1.93 a	130.81 ± 3.25 d	706.38 ± 15.96 e	8.79 ± 1.30 d
C2	1608.55 ± 22.52 a	1505.79 ± 77.55 ab	58.96 ± 4.24 bc	156.45 ± 2.52 bc	782.87 ± 46.28 de	12.74 ± 2.30 ab

2.6 水稻秧苗抗寒基因表达

喷施乙烯利后，水稻体内的 *TERF2*、*OsCDPK7*、*OsLti6A* 和 *OsCOIN* 基因的表达量均有不同程度的上升。无土基质育成的秧苗体内 *OsCOIN*、*OsTERF2*、*OsICE1*、*OsLti6A*、*COLD1* 和 *OsCDPK7* 基因的表达量较其对照显著提升了 0.82 倍、18.96 倍、7.02 倍、0.52 倍、2.60 倍和 35.34 倍 (图 3)；发酵基质育成的秧苗体内 *OsCOIN*、*TERF2*、*OsICE1*、*COLD1* 和 *OsCDPK7* 的表达量较其对照显著提升了 0.61 倍、19.05 倍、6.09 倍、3.87 倍和 178.39 倍 (图 3)；营养土育成的秧苗体内 *OsCOIN*、*TERF2*、*OsLti6A*、和 *OsCDPK7* 的表达量较其对照显著提升了 79.31 倍、

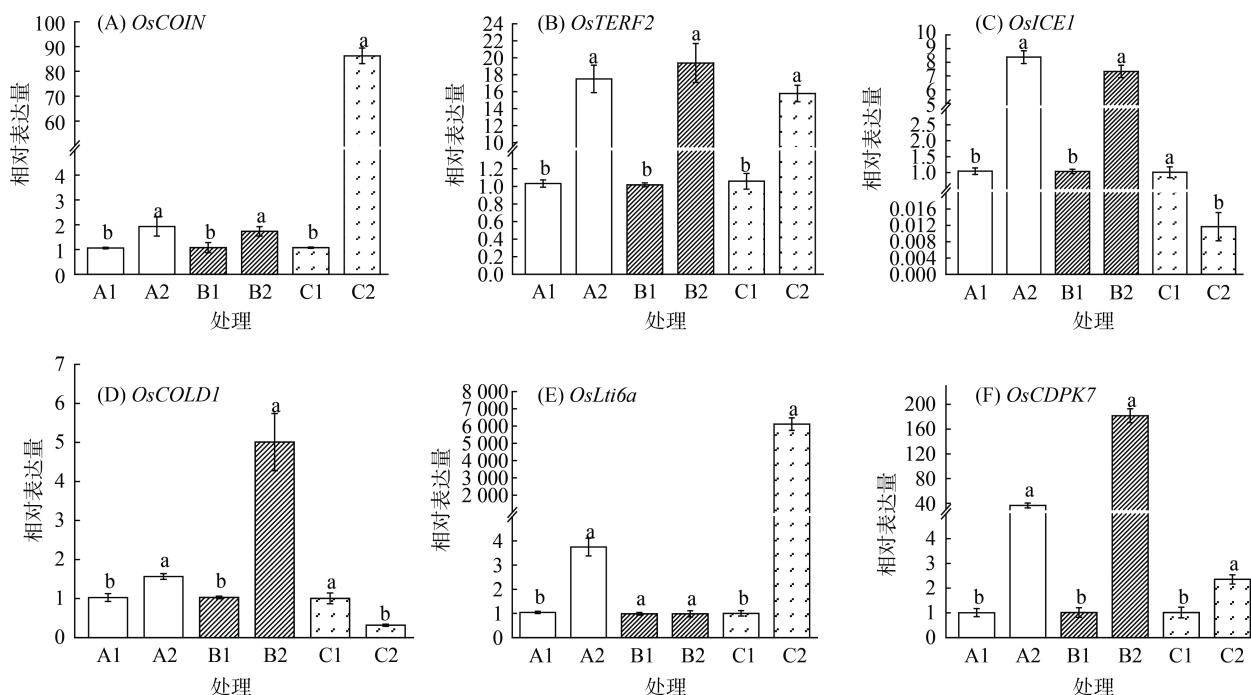
13.91 倍、6 087.18 倍和 1.32 倍 (图 3)。

低温条件下，乙烯利处理增加了无土基质和发酵基质育成秧苗体内的耐冷基因表达，然而显著降低了营养土育成的秧苗体内 *OsICE1* 和 *COLD1* 基因的表达量，这可能与基质种类有关 (图 3C 和图 3D)。

3 讨论

3.1 基质类型与水稻耐低温能力

在 3 种基质中，无土基质除了全钾含量显著低于营养土，其他养分均显著高于营养土，而发酵基质养分含量均显著高于营养土 (表 1)。本课题组前期研究发现，由无土基质和发酵基质育成的秧苗耐寒性更强^[8]。



(图中不同小写字母表示同一基质两处理间差异在 $P < 0.05$ 水平上显著)

图 3 低温条件下乙烯利处理后水稻秧苗耐冷基因相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of cold tolerance genes in rice seedlings treated with Ethephon at low temperature

本研究结果发现,低温条件处理后,无土基质和发酵基质生长的秧苗,其叶龄和体内全氮含量等均显著高于营养土育成的秧苗(表 5)。同时,无土基质和发酵基质育成的秧苗具有更低的 H_2O_2 含量,更高的抗氧化酶活性(表 6)和 AsA/DHA 比率(图 2)。说明与传统方式营养土育秧相比,本课题组自制的无土基质和发酵基质在低温条件下可通过加大水稻对养分的吸收和降低低温引起的过氧化损伤提高水稻秧苗的耐寒性,这与前期研究结果一致。

3.2 乙烯利提高低温下水稻秧苗素质

低温胁迫主要通过减少植物叶片的栅栏组织厚度,造成植株生物量减少,从而影响植株形态建成、物质合成与积累^[12]。本研究中,低温条件下水稻秧苗生长受阻,而外源施加乙烯利处理可以显著提高水稻秧苗的株高、叶龄和根数(表 4),说明在低温条件下外源施加乙烯利可以使水稻秧苗保持较好的生长。

然而,乙烯利抑制了水稻秧苗的根系伸长,这可能与乙烯的“三重反应”相关。外源乙烯引起黑暗中生长的黄化苗出现明显的形态学变化,包括根和下胚轴伸长受抑制,下胚轴横向生长加粗,顶端子叶弯曲生长加剧^[13]。而在本试验中也发现,在 3 种基质中,低温条件下乙烯利处理的秧苗根系伸长和干物质积累都要显著低于对照,这也进一步证实,在低温条件下乙烯对于植物根的伸长生长有着严重抑制作用。

3.3 乙烯利通过提高水稻磷元素的吸收响应低温胁迫

低温条件下,植物体内磷能够提高细胞结构的充水度和胶体束缚水的能力,减少细胞水分的损失并能增加原生质的黏合性和弹性,从而增加原生质对局部脱水的抵抗力;同时,磷还能维持和调节植物体内新陈代谢过程^[14],使其在低温条件下仍能保持较高的合成水平,增加植物体内可溶性糖类、磷脂等浓度提高植株的抗寒、抗旱等能力。在本次试验中,乙烯利处理后显著提高水稻秧苗体内的磷含量(表 5),说明乙烯利通过促进水稻秧苗对磷的吸收提高其耐寒性。

3.4 乙烯利通过提高水稻秧苗渗透调节物质含量响应低温胁迫

脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白是植物体中重要的渗透调节物质,在植物遭受低温胁迫时,植物中的脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量会自动积累,达到降低冰点和防止细胞脱水的效果^[15]。适宜浓度的乙烯利处理可显著提高桃树在低温条件下的脯氨酸和可溶性蛋白含量^[16]。外源施加乙烯利可以通过提高日本结缕草体内脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白的含量,调节细胞渗透势,减小低温损害^[17]。在本次试验中,外源施加乙烯利处理明显提高 3 种基质中水稻秧苗的脯氨酸和可溶性糖含量(图 1),说明低温条件下外源施加乙烯利通过提高水稻秧苗的脯氨酸和

可溶性糖含量调节水稻秧苗渗透势,从而提高水稻秧苗的抗寒性。

3.5 乙烯利通过调控水稻秧苗体内氧化还原水平提高水稻耐低温胁迫能力

H_2O_2 是生物细胞代谢过程中产生的一种活性氧,当植物受到逆境胁迫时,其含量急剧上升,造成植物的过氧化损伤。AsA 是辅酶、自由基清除剂、电子共体/受体和草酸盐与酒石酸盐生物合成的底物,DHA 是 AsA 的可逆的氧化型,与抗坏血酸共同组成氧化还原系统^[18-19]。在本试验中,低温条件下外源施加乙烯利显著降低发酵基质和营养土育成秧苗的 H_2O_2 含量,同时提高无土基质、发酵基质和营养土 3 种基质育成秧苗的 AsA 含量和 AsA/DHA 比率(图 2)。说明低温条件下,乙烯利通过提高水稻秧苗的 AsA 含量和 AsA/DHA 比率降低水稻体内的 H_2O_2 含量,从而缓解低温胁迫引起的过氧化损伤。

植物遭受逆境胁迫时体内活性氧 (ROS)含量上升,此时植物体内抗氧化系统对缓解逆境胁迫引起的过氧化损伤起重要作用^[20]。SOD 通过特异地将 O_2 歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,随后通过 CAT、POD 和 APX 等将植物体内的过氧化物氧化为 H_2O 等无害物质。GST 是植株内的解毒酶,主要催化各种化学物质和代谢产物与 GSH 的巯基共价键结合,使亲水化合物变成亲水物质,从而达到将植株体内潜在或具有毒性的物质降解的效果。GSH-Px 是谷胱甘肽氧化还原循环中催化 GSH 氧化的主要酶之一。GPX 能够特异地催化 GSH 与 ROS 反应,生成 GSSG,从而保护生物膜免受 ROS 的损害,维持细胞的正常功能。适宜浓度的乙烯利可以通过提高低温条件下植株体内抗氧化酶的活性来提高植物的抗寒性。比如,低温条件下,用 200 mg/L 乙烯利喷洒香蕉幼苗叶片,可显著提高香蕉叶片的 SOD、POD 和 CAT 活性^[21]。乙烯利和硒配合使用时,显著提高低温条件下铁皮石斛体内 CAT、SOD 和 POD 活性。在本试验中,与对照相比,低温条件下进行乙烯利处理,使 3 种基质育成秧苗体内的 POD、SOD、GST、GPX 和 APX 五种抗氧化酶活性均有不同程度提升(表 6)。说明低温条件下,乙烯利通过提高水稻秧苗的抗氧化酶活性来减少水稻秧苗的 H_2O_2 含量,从而提高水稻秧苗在低温条件下的抗寒性。

3.6 乙烯利通过提高水稻秧苗抗寒基因表达响应低温胁迫

众多基因参与调控水稻响应低温胁迫。过表达的 *TERF2* 不仅可以增加渗透物质和叶绿素含量,还能

降低 ROS 和丙二醛(MDA)的含量,减少电解质的渗漏和诱导其他耐冷相关基因的表达^[22]。*OsCOIN* 编码环型锌指蛋白,受低温、ABA、盐和干旱强烈诱导。*OsCOIN* 的过量表达,上调了 *OsP5CS* 的表达,增加了细胞内脯氨酸含量,最终显著增强了转基因水稻对冷、盐和干旱的抗性^[23]。在本试验中,外源施加乙烯利显著增加 *TERF2* 和 *OsCOIN* 基因的表达,提高了水稻体内的脯氨酸和可溶性糖含量(图 1),说明乙烯利处理会通过提高水稻 *TERF2* 和 *OsCOIN* 的表达量来增加体内渗透物质的合成,从而缓解水稻秧苗冷胁迫。

OsCDPK7 是水稻体内与编码 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶(CDPK)有关的基因,当 *OsCDPK7* 基因过表达时,可显著缓解水稻遭受的冷胁迫^[24]。在本试验中,外源施加乙烯利显著提高秧苗体内 *OsCDPK7* 基因的表达量。这说明低温条件下,乙烯利处理可诱发 *OsCDPK7* 的过量表达,从而提高水稻秧苗在低温条件下的抗寒性。

低温会引起脂质双分子层从灵活的液晶相到固体凝胶相的转变,从而触发细胞膜的功能异常,同时膜脂质构象的变化往往会导致细胞内溶质的渗透性增加和泄漏^[25]。而 *OsLti6a* 基因则可通过保护水稻质膜在低温胁迫下的完整性缓解冷胁迫^[26]。在本试验中,外源施加乙烯利显著提高水稻秧苗 *OsLti6a* 基因的表达量。说明低温条件下外源施加乙烯利处理会通过提高水稻耐寒基因 *OsLti6a* 表达量,从而通过保护质膜的完整性提高水稻在低温条件下的耐寒性。

OsICE1 是一个膜相关转录因子,调控冷胁迫诱导的上游转录因子基因如 *OsDREB1B* 和 *OsHsfA3* 的表达,从而使水稻适应寒冷环境^[27]。*COLD1* 是定位于质膜和内质网上的冷敏感基因,它能与 G 蛋白 α 亚基 RGA1 互作以感知低温,激活 Ca^{2+} 通道,并增强 G 蛋白 GTP 酶活性,从而增强水稻的耐寒性^[28]。在本次试验中,低温条件下外源施加乙烯利处理会诱导无土基质和发酵基质生长秧苗的冷胁迫基因 *OsICE1* 和 *COLD1* 的表达量上调,而对于在低温条件下营养土生长的秧苗,外源施加乙烯利处理则会使冷胁迫基因 *OsICE1* 和 *COLD1* 的表达量下调,这可能是由于基质种类的不同所引起的。

4 结论

外源喷施乙烯利显著逆转低温胁迫对水稻生长的抑制作用。乙烯通过提高水稻秧苗对营养元素磷的吸收,提高水稻体内渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖

含量, 增强秧苗体内抗氧化系统酶活性, 提高水稻秧苗的氧化还原状态 (AsA/DHA 比率), 提高秧苗内冷胁迫基因 *OsCOIN*、*TERF2*、*OsLti6a* 和 *OsCDPK7* 的表达量来提高水稻秧苗的低温抗性。同时, 不同育秧基质之间育成的秧苗其耐冷性存在显著差异。

参考文献:

- [1] 肖宇龙, 邱在辉, 林洪鑫, 等. 苗期低温对早稻品种产量相关性状的影响[J]. 江西农业学报, 2014, 26(7): 1-4.
- [2] Houben M, van de Poel B. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 695.
- [3] Wan L Y, Zhang J F, Zhang H W, et al. Transcriptional activation of *OsDERF₁* in *OsERF₃* and *OsAP2-39* negatively modulates ethylene synthesis and drought tolerance in rice[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25216.
- [4] 陈发棣, 陈素梅, 宋爱萍, 等. 乙烯调控植物耐涝机制的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(2): 203-208.
- [5] 方琳. 拟南芥乙烯合成因子与 IAA 共同调节盐胁迫机制分析[D]. 开封: 河南大学, 2012.
- [6] Quan R D, Hu S J, Zhang Z L, et al. Overexpression of an ERF transcription factor *TSRF₁* improves rice drought tolerance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(4): 476-488.
- [7] 陈丹丹. 乙烯调节拟南芥根构型的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [8] 朱春权, 徐青山, 曹小闯, 等. 不同属性特征基质对早稻秧苗耐低温的影响[J]. 中国水稻科学, 2021, 35(5): 503-512.
- [9] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [10] Stoscheck C M. Quantitation of protein[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 182: 50-68.
- [11] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies[J]. *Plant and Soil*, 1973, 39(1): 205-207.
- [12] 孙三杰, 李建明, 宗建伟, 等. 亚低温与干旱胁迫对番茄幼苗根系形态及叶片结构的影响[J]. 应用生态学报, 2012, 23(11): 3027-3032.
- [13] Ecker J R. The ethylene signal transduction pathway in plants[J]. *Science*, 1995, 268(5211): 667-675.
- [14] 付家兵. 磷效率相关根形态构型性状的遗传与进化分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2005.
- [15] 黄伟超, 范宇博, 王泳超. 低温胁迫对玉米幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响[J]. 中国农学通报, 2018, 34(24): 6-12.
- [16] 丁欣欣. 不同时期喷施乙烯利对核桃物候期和抗寒性的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2019.
- [17] 张智韦. 乙烯利对低温胁迫下日本结缕草叶绿素代谢通路的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
- [18] 范邓鹏. 脱氢抗坏血酸在低温诱导烟草早花过程中的作用及其信号途径分析[J]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [19] Horemans N, H Foyer C, Potters G, et al. Ascorbate function and associated transport systems in plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, 38(7/8): 531-540.
- [20] 韩金龙, 王同燕, 徐立华, 等. 铅胁迫对糯玉米幼苗叶片叶绿素含量及抗氧化酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(S1): 121-123.
- [21] 韦弟, 李杨瑞, 邸南南, 等. 乙烯利提高香蕉幼苗抗寒性的生理效应[J]. 热带作物学报, 2009, 30(10): 1447-1451.
- [22] Tian Y, Zhang H W, Pan X W, et al. Overexpression of ethylene response factor *TERF₂* confers cold tolerance in rice seedlings[J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(4): 857-866.
- [23] Liu K M, Wang L, Xu Y Y, et al. Overexpression of *OsCOIN*, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice[J]. *Planta*, 2007, 226(4): 1007-1016.
- [24] Ye S F, Wang L, Xie W B, et al. Expression profile of calcium-dependent protein kinase (CDPKs) genes during the whole lifespan and under phytohormone treatment conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica)[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(3): 311-325.
- [25] Kratsch H A, Wise R R. The ultrastructure of chilling stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2000, 23(4): 337-350.
- [26] Morsy M R, Almutairi A M, Gibbons J, et al. The *OsLti6* genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature[J]. *Gene*, 2005, 344: 171-180.
- [27] Nakamura J, Yuasa T, Huong T T, et al. Rice homologs of inducer of CBF expression (*OsICE*) are involved in cold acclimation[J]. *Plant Biotechnology*, 2011, 28(3): 303-309.
- [28] Shi Y T, Gong Z Z. One SNP in *COLD1* determines cold tolerance during rice domestication[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42(4): 133-134.