

DOI: 10.5846/stxb202002150263

孙海燕,孔德庸,胡慧影,牡丹凤,马传芳,郭伟.腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗抗氧化系统的影响.生态学报,2021,41(13):5385-5397.

Sun H Y, Kong D Y, Hu H Y, Du D F, Ma C F, Guo W. Effects of soaking seed with humic acid on antioxidant system of maize seedlings under low-temperature stress. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(13): 5385-5397.

腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗抗氧化系统的影响

孙海燕^{1,2}, 孔德庸¹, 胡慧影¹, 牡丹凤¹, 马传芳¹, 郭 伟^{1,2,*}

1 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319

2 黑龙江省现代农业栽培技术与作物种质改良重点实验室, 大庆 163319

摘要:低温冷害是导致黑龙江省玉米产量不稳、品质不高的重要农业气象灾害,而关于低温胁迫下玉米抗氧化应激能力和程度的研究较少。采用清水为对照(CK),以腐植酸质量浓度为0.2%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%和2.0%浸种,研究了昼夜温度为15℃/8℃低温胁迫48 h下玉米幼苗的代表性抗氧化酶活性、抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环、系统抗性及碳氮代谢的变化,以明确腐植酸对玉米的耐低温胁迫响应机制及适宜的浸种浓度。结果表明:低温胁迫条件下腐植酸浸种主要受过氧化氢(H₂O₂)积累诱导,随着浸种浓度的增加,大多数抗氧化酶和系统抗性酶活性、AsA-GSH循环、碳氮代谢主要物质含量、根系活力和鲜重均呈单峰曲线分布,其中0.8%—2.0%浓度处理的叶片和根系可溶性蛋白含量分别显著增加了23.3%—34.9%和31.9%—89.6%;1.6%浓度处理的叶片和根系苯丙氨酸解氨酶活性分别显著增加了16.8%和38.8%,多酚氧化酶活性分别增加了27.7%和13.4%,抗坏血酸含量分别显著增加了62.6%和55.3%,脱氢抗坏血酸含量分别显著增加了31.9%和66.4%;0.8%浓度处理的叶片和根系过氧化氢酶活性分别显著增加了66.4%和108.1%。因此,腐植酸浸种处理的叶片H₂O₂含量较对照显著降低了18.7%—37.6%,根系H₂O₂含量显著降低了27.5%—49.7%。0.4%和0.8%浓度处理的根系鲜重较对照分别显著增加了85.2%和105.3%,单株鲜重分别显著增加了31.9%和40.8%。腐植酸0.4%—0.8%处理增强了AsA为核心的AsA-GSH循环系统的运转活性和系统抗性,提高了玉米幼苗的抗氧化应激能力,获得最大的根系活力和植株鲜重,是水培条件下较为适宜的浸种浓度。

关键词:玉米; 低温胁迫; 抗氧化系统; 腐植酸

Effects of soaking seed with humic acid on antioxidant system of maize seedlings under low-temperature stress

SUN Haiyan^{1,2}, KONG Deyong¹, HU Huiying¹, DU Danfeng¹, MA Chuanfang¹, GUO Wei^{1,2,*}

1 College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

2 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Modern Agricultural Cultivation and Germplasm Improvement, Daqing 163319, China

Abstract: Chilling damage in Heilongjiang Province is an important agricultural meteorological disaster that leads to unstable maize yield and low quality in this region. However, there are few studies on the ability and degree of antioxidant stress in maize under low-temperature stress. Mass concentration of humic acid were 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6% and 2.0%, and water as the control, the changes of activities of representative antioxidant enzymes, ascorbic acid-glutathione (AsA-GSH) cycle, systemic resistance and carbon-nitrogen metabolism of maize seedlings under low-temperature stress of day and night for 48 h at 15℃/8℃ were studied to illustrate the tolerance mechanism of humic acid for low-temperature stress and the appropriate concentration of soaking seed. The results showed that soaking seed with humic acid was mainly induced by H₂O₂ accumulation under low temperature stress. With the increase of seed soaking concentration, most of the

基金项目:国家重点研发计划课题(2017YFD0300502);国家科技重大专项和重点研发项目(课题)省级资金资助课题(GX18B040)

收稿日期:2020-02-15; **修订日期:**2021-03-31

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: agrigw@163.com

activity of antioxidant enzymes and system resistance enzymes, the AsA-GSH cycle and main substance content of carbon and nitrogen metabolism, root activity and fresh weight showed unimodal curve distribution. The soluble protein content of leaves and roots increased by 23.3%—34.9% and 31.9%—89.6% at the concentration of 0.8%—2.0%, respectively. The activity of phenylalanine ammonia-lyase increased by 16.8% and 38.8%, the activity of polyphenol oxidase increased by 27.7% and 13.4%, the content of ascorbic acid increased by 62.6% and 55.3%, and the content of dehydroascorbic acid increased by 31.9% and 66.4% in leaves and roots at the concentration of 1.6%, respectively. The activity of hydrogen peroxide in leaves and roots increased by 66.4% and 108.1% at the concentration of 0.8%. Therefore, H_2O_2 content in leaves and roots after soaking seed significantly reduced by 18.7%—37.6% and 27.5%—49.7% compared with the CK, respectively. The fresh root weight increased significantly by 85.2% and 105.3%, and the fresh weight of single plant increased significantly by 31.9% and 40.8% at the concentration of 0.4% and 0.8% compared with the control, respectively. In this study, the treatment at the concentration of 0.4%—0.8% enhanced the operation activity and systemic resistance of the AsA-GSH circle system with AsA as the core, improved the antioxidant stress ability of maize seedlings, and obtained the maximum root activity and fresh weight of plant, which were a relatively appropriate seed soaking concentration under hydroponic condition.

Key Words: maize; low-temperature stress; antioxidant system; humic acid

黑龙江省作为全国重要商品粮基地,玉米是其种植面积最大的作物。该地区作为典型的一年一熟制春玉米生产区域,多在4月下旬开始播种,苗期气温频繁波动,低温冷害(甚至“倒春寒”)作为该地区主要农业气象灾害^[1-2],已成为导致玉米产量不稳、品质不高的主要原因^[3]。低温诱导产生活性氧损伤膜的结构^[4],而植物对低温的最初响应就是调整生物膜本身的膜脂不饱和度及改善低温下膜的流动性^[5-6],以增强植物抗氧化应激能力。抗氧化能力的强弱是由系列小分子物质含量和抗氧化酶活性决定的^[7],如超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)、过氧化氢酶(CAT, catalase)和抗坏血酸过氧化物酶(APX, ascorbate peroxidase)等。超氧自由基(SAR, superoxide anion radical)在SOD作用下转化为过氧化氢(H_2O_2 , hydrogen peroxide),进而在CAT、POD或抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH, ascorbic acid-reduced glutathione)循环系统的作用下分解为 H_2O ^[4]。同时,抗坏血酸(AsA, ascorbic acid)、谷胱甘肽(GSH, reduced glutathione)、维生素E和类胡萝卜素等低分子量抗氧化剂^[8],也可直接与SAR、分子单态氧和羟基自由基相互作用,参与活性氧的非酶清除^[9]。低温是破坏植物代谢过程和细胞结构的主要环境压力之一,由于玉米原产于热带,对低温胁迫特别敏感^[10]。黑龙江地区频发的低温冷害具有明显的区域性和季节性特征^[2],短时低温危害对作物生长影响不大,但持续3 d以上14℃以下的温度将对玉米产量形成不利影响^[11-12]。因此,提高玉米的耐低温能力,尤其是研究玉米苗期的耐低温机制及栽培技术,对提高该地区玉米生产能力具有重要的意义^[13]。尽管有大量的工作致力于低温胁迫下玉米细胞中低分子量抗氧化剂和抗氧化酶作用机制的研究,但关于玉米幼苗对低温的代谢反应及系统响应研究不多。腐植酸作为一种自然界中广泛存在的大分子有机物质,用其处理作物种子,可以显著提高作物对非生物胁迫的耐受能力^[14]。腐植酸浸种可显著提高干旱胁迫下谷子的发芽势和活力指数,有效缓解干旱胁迫对谷子的伤害^[15];有效提高小麦叶片GSH含量、SOD和CAT活性^[16];促进可溶性糖积累,提高根系渗透性,有效缓解盐碱胁迫对小麦幼苗的质膜损伤^[17]。叶片外源施用腐植酸^[18-19]或与化肥一起根际施用^[20]也可提高抗氧化酶活性,增加游离脯氨酸含量^[19],减缓叶绿素分解^[18],增强根系活力^[20],提高作物的抗旱性。因此,本文在前期研究基础上^[16-17],参考腐植酸处理玉米种子方法^[21],研究了15℃/8℃的低温胁迫下玉米幼苗的代谢活性、系统抗性和抗氧化能力,以明确腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗的耐逆生理机制及适宜浓度,为黑龙江省玉米高产稳产栽培技术研究与应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用玉米(*Zea mays* L.)品种为郑单 958。腐植酸($C_9H_9NO_6$,分子量 227.16)由四川西亚化工股份有限公司制造。

1.2 研究方法

选取籽粒饱满、均匀一致的玉米种子,用 2%次氯酸钠溶液消毒种子 30 min,蒸馏水反复冲洗干净,用滤纸将表面水分吸干。然后分别用质量浓度为 0(蒸馏水)、0.2%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%的腐植酸溶液在室温条件下浸种 12 h,用蒸馏水将种子冲洗干净,将其分别整齐摆放在铺有双层滤纸的发芽盒中,在温度为 20℃、相对湿度为 70%的培养箱中培养 7 d,期间根据滤纸湿度情况及时补充蒸馏水。7 d 后选取整齐一致的幼苗移植于带有圆孔的泡沫板上(10 株/盒),在塑料方盒(30 cm×50 cm)中用 1/2 Hoagland 营养液培养,培养条件为光照度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,温度 20℃,光周期 12 h/12 h,每 3 d 更换 1 次营养液,待玉米幼苗第 3 片叶完全展开后进行低温胁迫。将不同浓度浸种处理的幼苗在昼夜温度为 15℃/8℃ 下进行低温胁迫培养,每个处理重复 3 次,胁迫培养 48 h 后取样测定。

每个处理选取整齐一致的 8 株幼苗,将幼苗分为根系与地上两部分,用滤纸吸干表面水分,然后用电子天平(精度 0.01 g)分别测定根系和地上部 8 株总鲜重,根系鲜重与地上部分鲜重比值即为根冠比。测定后迅速用液氮冷冻并置于-80℃冰箱保存。分别参照刘萍等^[22]的方法采用氯化硝基四氮唑蓝光还原法测定 SOD 活性;采用紫外吸收法测定 CAT 活性;采用愈创木酚比色法测定 POD 活性;采用羟胺氧化法测定 SAR 产生速率;采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛(MDA, malondialdehyde)含量;采用考马斯亮蓝比色法测定可溶性蛋白质(SP, soluble protein)含量;采用蒽酮比色法测定可溶性糖(SS, soluble sugar)含量;采用 2,6-二氯酚靛酚法测定 AsA、脱氢抗坏血酸(DHAA, dehydroascorbic acid)含量;采用二硫代(2-二硝基苯甲酸)法测定 GSH、氧化型谷胱甘肽(GSSG, oxidized glutathione)含量;采用分光光度法测定 APX 活性;采用氯化三苯基四氮唑法测定根系活力。参照中国科学院上海植物生理研究所^[23]的方法采用分光光度法测定苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)、多酚氧化酶(PPO, polyphenol oxidase)活性及 H_2O_2 含量。

1.3 数据处理

利用 WPS 进行数据处理、分析及绘图,SPSS Statistics 25 软件进行数据统计分析。Duncan 新复极差法进行差异显著性检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米植株代谢活性与鲜重的影响

由图 1 可知,随着腐植酸浸种浓度的增加,低温胁迫下玉米单株鲜重和根冠比呈单峰曲线,峰值出现在 0.4%的处理浓度。其中,0.2%—0.8%腐植酸浸种处理的单株鲜重较对照显著增加了 31.9%—40.8%,腐植酸浸种浓度 $\geq 1.2\%$ 处理的单株鲜重与对照间无显著差异;根冠比显著高于对照 41.8%—84.7%。

由图 2 可知,地上部和根系鲜重与单株鲜重变化相似,随着腐植酸浸种浓度的增加,地上部鲜重和根系鲜重也呈单峰曲线,峰值出现在 0.4%的处理浓度,但地上部鲜重与对照间无显著差异;0.2%—1.2%处理的根系鲜重较对照显著增加了 38.7%—105.3%。因此,腐植酸浸种主要促进了低温胁迫下玉米幼苗根系的生长,从而增加了植株的鲜重,但腐植酸处理浓度 $\geq 1.2\%$ 则抑制地上部生长,且对根系生长的促进作用也减弱。

由图 3 可知,低温条件下腐植酸浸种促进幼苗生长的主要途径是提高了植株的氮代谢水平,而对碳代谢影响不显著(图 4)。随着浸种浓度的增加,叶片和根系的可溶性蛋白含量呈单峰曲线,峰值分别出现在 1.2%和 1.6%的浓度处理;0.4%—2.0%浓度处理的叶片可溶性蛋白含量显著高于对照 23.3%—34.9%;0.8%—2.0%浓度处理的根系可溶性蛋白含量高于对照 31.9%—89.6%。由此可知,叶片的可溶性蛋白积累对腐植酸

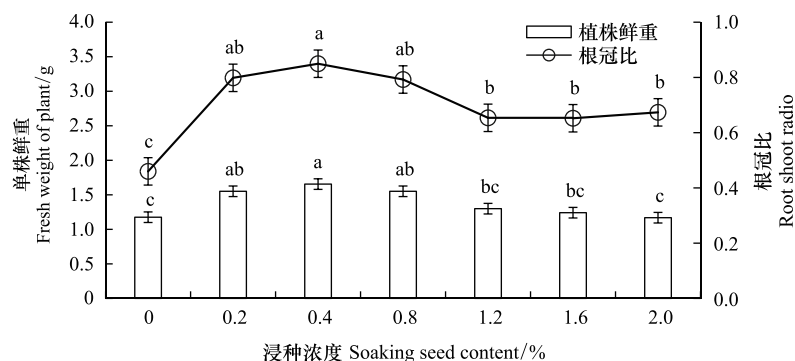


图1 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米单株鲜重和根冠比的影响

Fig.1 Effects of soaking seed with humic acid on plant fresh weight and root shoot ratio of maize seedlings under low temperature stress
不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

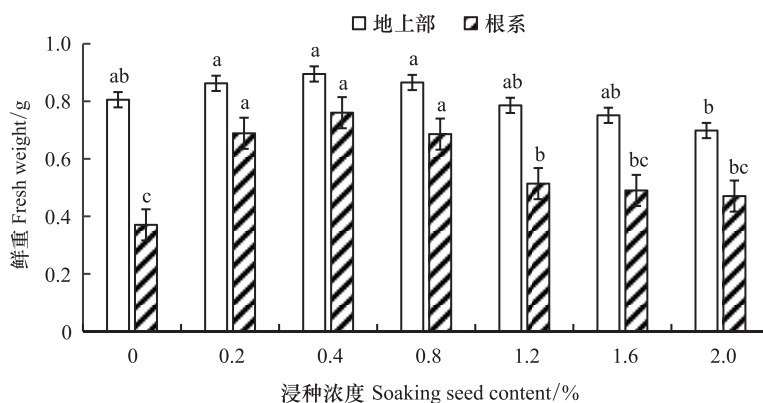


图2 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗地上部鲜重和根系鲜重的影响

Fig.2 Effects of soaking seed with humic acid on fresh weight of shoot and root in maize seedlings under low temperature stress

浸种处理的响应时间早于根系,但响应程度小于根系。腐植酸浸种处理的叶片和根系可溶性糖的含量与对照间无显著差异。

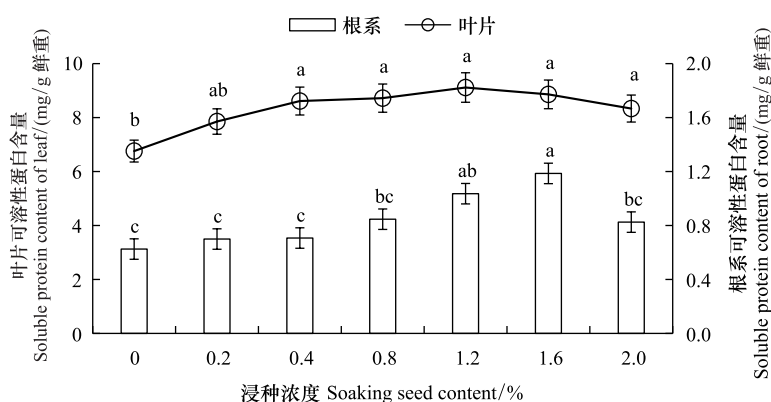


图3 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of soaking seed with humic acid on soluble protein content in maize seedlings under low temperature stress

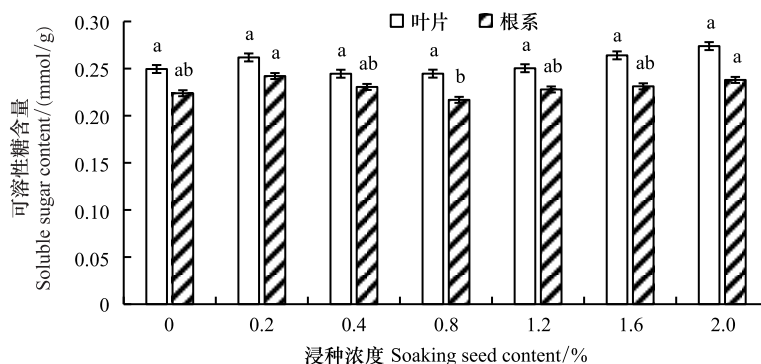


图4 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗可溶性糖含量的影响

Fig.4 Effects of soaking seed with humic acid on soluble sugar content in maize seedlings under low temperature stress

2.2 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗根系活力与系统抗性的影响

低温条件下腐植酸浸种可不同程度的增强植株对胁迫的系统响应,主要表现为系统抗性的代表性酶PAL、PPO活性及根系活力的提高。由图5可知,低温胁迫条件下腐植酸浸种处理的叶片和根系的PAL活性均不同程度的增强,在1.6%浓度处理出现PAL峰值,分别较对照显著增加了16.8%和38.8%,且各浓度处理下根系的PAL活性增加的幅度大于叶片各相同处理。

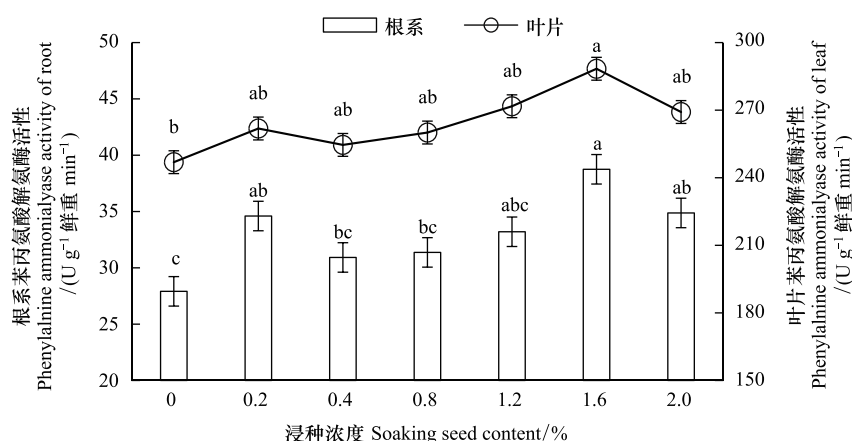


图5 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响

Fig.5 Effects of soaking seed with humic acid on phenylalanine ammonia-lyase activity in maize seedlings under low temperature stress

低温胁迫条件下腐植酸浸种对玉米植株PPO活性的影响与PAL相似(图6),不同的是叶片的PPO活性峰值出现在1.6%浓度处理,较对照显著增加了27.7%,而根系的PPO活性峰值出现在2.0%浓度处理,较对照显著增加了23.4%,当浸种浓度 $\leq 0.4\%$,根系PPO活性增加的幅度大于叶片,而处理浓度 $> 0.4\%$ 时,PPO活性增加幅度小于叶片。

当腐植酸浸种浓度为1.6%时,PAL和PPO活性显著增加,而根系活力随着浓度的增加呈单峰曲线(图7),其中,0.4%和0.8%浓度处理的根系活力最高,较对照分别显著提高了25.1%和25.0%。综合根系的鲜重、根冠比及植株蛋白质含量的变化分析可知,低浓度浸种促进了根系的生长,且随着浓度的增加对根系发育的影响减弱,但逐步增强了植株的系统抗性。

2.3 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米植株抗氧化特性的影响

由表1可知,随着腐植酸浸种浓度的增加,玉米幼苗叶片SAR呈现不同程度的降低,其中1.6%和2.0%浓度处理的SAR较对照分别显著降低了24.3%和23.0%,而根系SAR与对照间无显著差异。SOD作为受超氧

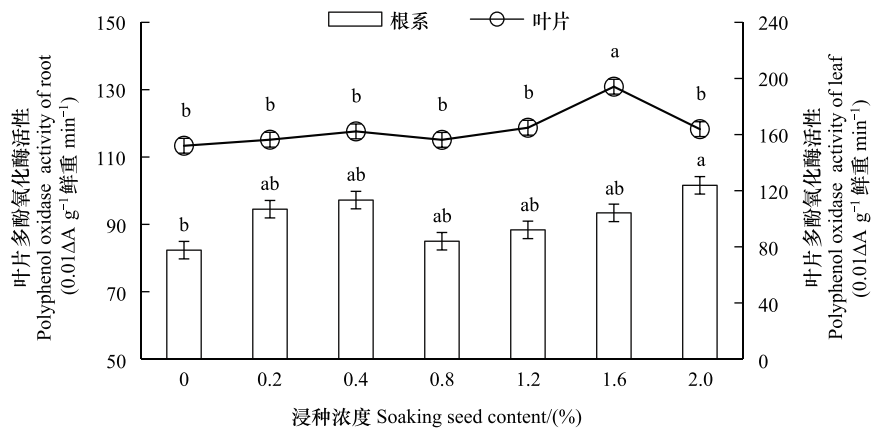


图6 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗多酚氧化酶(PPO)活性的影响

Fig.6 Effects of soaking seed with humic acid on polyphenol oxidase activity in maize seedlings under low temperature stress

自由基诱导的抗氧化酶,其活性受浸种浓度影响较小,只有2.0%浓度处理的叶片SOD活性较对照显著降低了64.8%,其他处理叶片与根系的SOD活性与对照间无显著差异。

超氧自由基发生歧化反应后生成的过氧化物进一步诱导抗氧化酶活性的增强,腐植酸浸种处理下叶片和根系的CAT活性呈单峰曲线,其中0.4%和0.8%浓度处理的叶片CAT活性较对照分别增加了101.7%和66.4%;0.8%和1.2%浓度处理的根系CAT活性较对照分别增加了108.1%和98.5%。随着浸种浓度的增加,叶片POD活性呈单峰曲线,但与对照间无显著差异;根系POD活性与对照间无显著差异。

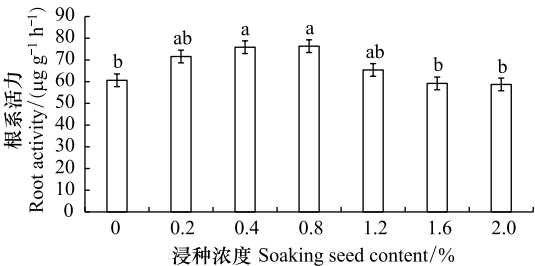


图7 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗根系活力的影响

Fig.7 Effects of soaking seed with humic acid on root activity in maize seedlings under low temperature stress

表1 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米氧化特性及抗氧化酶活性的影响

Table 1 Effects of soaking seed with humic acid on oxidation characteristics and antioxidant enzyme activity in maize under low temperature stress

植株 Plant	HAC/%	SAR/ (μg g ⁻¹ min ⁻¹ 鲜重)	SOD/ (U g ⁻¹ min ⁻¹ 鲜重)	CAT/ (U g ⁻¹ min ⁻¹ 鲜重)	POD/ (×10 ³ U g ⁻¹ min ⁻¹ 鲜重)	H ₂ O ₂ / (μmol/g 鲜重)
叶片 Leaf	0	10.79a	0.66a	200.96c	2.17abc	44.50a
	0.2	9.74ab	0.68a	189.85c	1.81c	36.18b
	0.4	9.92a	0.66a	405.31a	2.71a	33.01bc
	0.8	9.35ab	0.63a	334.33ab	2.52ab	34.43b
	1.2	9.37ab	0.58a	298.54bc	2.48ab	27.76c
	1.6	8.17b	0.45a	204.18c	2.51ab	28.16c
	2.0	8.31b	0.23b	216.23c	1.94bc	29.06c
根系 Root	0	5.88a	1.76a	139.81b	12.81a	11.80a
	0.2	6.44a	1.96a	73.02b	13.24a	6.15c
	0.4	5.48a	1.80a	120.77b	12.79a	6.50c
	0.8	5.74a	1.59a	290.94a	12.35a	5.94c
	1.2	5.47a	1.69a	277.54a	12.51a	7.86bc
	1.6	5.94a	1.73a	175.57b	12.90a	7.88bc
	2.0	6.24a	1.74a	157.98b	13.69a	8.56b

HAC:腐植酸浸种 Soaking seed content with humic acid;SAR;超氧阴离子自由基 Superoxide anion radical;SOD;超氧化物歧化酶 Superoxide;dismutase;CAT;过氧化氢酶 Catalase;POD;过氧化物酶 Peroxidase;H₂O₂;过氧化氢 Hydrogen peroxide

腐植酸浸种处理的叶片 H_2O_2 含量显著低于对照 18.7%—37.6%, 根系 H_2O_2 含量显著低于对照 27.5%—49.7%, 且低浓度处理叶片 H_2O_2 含量大于高浓度处理, 而低浓度处理根系 H_2O_2 含量小于高浓度处理。结合 POD、CAT 活性变化可得到, H_2O_2 可能是低温胁迫下积累的过氧化物的主要成分。

由 GSH-AsA 循环(表 2)可知, 随着腐植酸浸种浓度的增加, 叶片的 GSH 含量逐渐增加, 而根系的 GSH 含量呈单峰曲线, 随着浸种浓度的增加, 叶片 GSSG 含量呈单峰曲线, 仅 0.8% 浓度处理的 GSSG 含量较对照显著增加了 25.4%, 而各处理的根系 GSSG 含量与对照间无显著差异。

随着腐植酸浸种浓度的增加, 叶片 AsA 含量呈单峰曲线, 峰值出现在 1.6% 的处理浓度, 其中 1.2% 和 1.6% 处理浓度的叶片 AsA 含量较对照分别增加了 37.4% 和 62.6%; 而根系的 AsA 含量随处理浓度的增加逐渐增加, 当处理浓度 $\geq 1.2\%$ 时, AsA 含量显著增加了 40.4%—58.6%。随着浸种浓度的增加, 叶片和根系的 DHAA 含量逐渐增加, 其中 1.6% 和 2.0% 浓度处理的叶片 DHAA 含量分别增加了 31.9% 和 36.2%; 当处理浓度 $\geq 1.2\%$ 时, DHAA 含量显著增加了 47.9%—70.3%。由此可知, 腐植酸浸种主要促进了 DHAA 形成, 提高了 GSH-AsA 循环活性。

随着腐植酸浸种浓度的增加, 叶片 APX 活性呈单峰曲线, 其中 0.8% 和 1.2% 浓度处理的叶片 APX 活性较对照分别显著提高了 72.3% 和 97.9%, 其他处理的叶片 APX 活性与对照相比差异不显著; 根系 APX 活性随着腐植酸浸种浓度的增加逐渐增加, 当处理浓度超过 1.6%, APX 活性降低, 但其他处理的酶活性均显著低于对照(1.2% 和 1.6% 浓度处理除外)。

表 2 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米抗坏血酸-谷胱甘肽循环活性的影响

Table 2 Effects of soaking seed with humic acid on the activity of ascorbic acid glutathione cycle in maize under low temperature stress

植株 Plant	HAC/%	GSH / ($\mu\text{g/g}$ 鲜重)	GSSG/ ($\mu\text{g/g}$ 鲜重)	AsA/ ($\mu\text{g/g}$ 鲜重)	DHAA/ (mg/g 鲜重)	APX/ ($\text{U g}^{-1} \text{min}^{-1}$ 鲜重)
叶片 Leaf	0	2.06ab	21.06bc	472.6c	2.55b	250.07b
	0.2	1.84b	19.02c	482.3c	2.53b	383.64ab
	0.4	2.29ab	23.64ab	588.0bc	2.59b	378.12ab
	0.8	2.23ab	26.40a	623.5bc	2.61b	430.83a
	1.2	2.43b	25.04ab	649.3b	2.88ab	494.88a
	1.6	2.40ab	24.64ab	768.3a	3.36a	384.19ab
	2.0	2.54a	22.80ab	560.0bc	3.48a	382.6ab
根系 Root	0	1.06ab	14.65a	594.2c	2.13c	88.62a
	0.2	1.09ab	15.02a	643.9c	2.00c	63.76b
	0.4	1.00b	15.11a	639.3c	2.36c	74.55b
	0.8	1.08ab	14.71a	724.9bc	2.71bc	64.82b
	1.2	1.13ab	13.46a	834.3ab	3.15ab	89.89a
	1.6	1.21a	12.95a	922.6a	3.55a	100.04a
	2.0	1.17ab	13.21a	942.7a	3.63a	67.06b

GSH:还原型谷胱甘肽 Reduced glutathione; GSSG:氧化型谷胱甘肽 Oxidized glutathione; AsA:抗坏血酸 Ascorbic acid; DHAA:脱氢抗坏血酸 Dehydroascorbic acid; APX:抗坏血酸过氧化物酶 Ascorbate peroxidase

MDA 是膜脂过氧化程度的重要衡量指标, 腐植酸浸种处理的叶片 MDA 含量较对照降低了 3.0%—30.0% (图 8), 其中 0.8%—1.6% 浓度处理的 MDA 含量显著降低了 22.0%—30.0%; 根系 MDA 含量较对照降低了 1.6%—45.7%, 其中 0.2%、0.4% 和 0.8% 浓度处理的根系 MDA 含量分别显著降低了 37.1%、45.7% 和 28.0%, 且明显低于相同处理的叶片, 而浓度处理 $\geq 0.8\%$, 根系与叶片 MDA 含量与对照相近。由此可见, 低浓度(0.2% 和 0.4%) 腐植酸浸种处理对低温胁迫下玉米幼苗的根系抗氧化保护作用较强, 中等浓度(0.8% 和 1.2%) 浸种处理对根系的保护作用减弱, 对叶片的抗氧化保护加强, 高浓度(1.6% 和 2.0%) 浸种对幼苗的抗氧化能力影响较小。

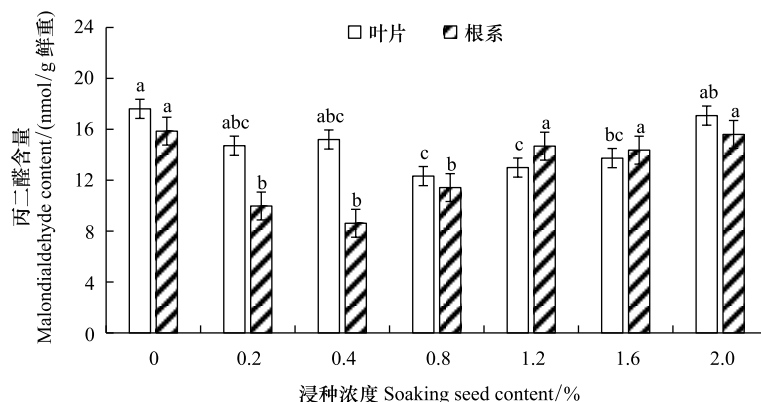


图8 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗丙二醛含量的影响

Fig.8 Effects of soaking seed with humic acid on malondialdehyde content in maize seedlings under low temperature stress

2.4 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米植株代谢、抗氧化特性及系统抗性间相关分析

由表3可知,低温胁迫和腐植酸浸种处理下幼苗SAR产生速率与SOD活性间显著正相关;根系SAR与叶片、根系CAT活性显著负相关;根系 H_2O_2 含量与叶片、根系的MDA含量显著正相关;叶片的 H_2O_2 含量与SOD活性间显著正相关。综合分析,SAR的产生诱导了SOD活性,低温条件下腐植酸浸种对SAR产生和SOD活性影响不显著,而CAT活性增强,且与SAR呈显著负相关,与 H_2O_2 含量无显著相关性;MDA含量与 H_2O_2 含量正相关,与SAR相关不显著。可见,低温胁迫条件下腐植酸浸种可消除 H_2O_2 积累,从而降低了膜脂过氧化程度,而依靠CAT活性增强消除 H_2O_2 并非主要途径。

表3 低温胁迫下玉米抗氧化酶系及膜脂过氧化间相关分析

Table 3 Correlation analysis between antioxidant enzyme system and membrane lipid peroxidation in maize under low temperature stress

指标 Indexes		SAR		H_2O_2		MDA	
		叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root
SOD	叶片	0.648 **	-0.252	0.504 *	-0.204	-0.290	-0.493 *
	根系	0.102	0.500 *	0.207	-0.088	0.284	-0.258
CAT	叶片	0.206	-0.494 *	-0.149	-0.368	-0.215	-0.385
	根系	-0.141	-0.520 *	-0.341	-0.071	-0.385	0.238
POD	叶片	0.040	-0.557 **	-0.221	-0.210	-0.287	-0.137
	根系	-0.229	0.306	-0.107	0.193	0.279	0.211
MDA	叶片	0.309	0.327	0.363	0.541 *	1.000	0.228
	根系	-0.232	0.128	-0.035	0.619 **	0.228	1.000

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; MDA: 丙二醛 Malondialdehyde

由表4可知,叶片SAR产生速率与幼苗的AsA、DHAA、GSH及GSSG等AsA-GSH循环主要物质含量间显著负相关;叶片 H_2O_2 含量与AsA-GSH循环也呈显著负相关;根系的MDA含量与AsA-GSH循环关系较为复杂,主要表现为根系的MDA含量与根系的AsA-GSH循环正相关,而叶片为负相关。由此可知,低温胁迫条件下腐植酸浸种提高了AsA-GSH循环强度,加强 H_2O_2 的清除,并且是 H_2O_2 清除的主要途径。

由表5可知,根系活力与根系的 H_2O_2 、MDA含量显著负相关,与叶片的SOD、CAT活性及根系GSSG含量显著正相关,与幼苗DHAA含量显著负相关。可见,低温胁迫下腐植酸浸种可能是通过加强根系对 H_2O_2 的清除能力起到减弱根系的膜脂过氧化程度,从而促进根系发育的一个重要途径。

PAL、PPO作为系统抗性的代表性酶,与叶片 H_2O_2 含量、根系的SOD活性显著负相关,与根系GSH、DHAA含量显著正相关。由此可知,低温胁迫下腐植酸浸种加强了根系AsA-GSH循环,提高了植株对 H_2O_2 的系统响应。

表 4 低温胁迫下玉米 AsA-GSH 循环及膜脂过氧化间相关分析

指标 Indexes		SAR		H ₂ O ₂		MDA	
		叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root
AsA	叶片	-0.540 *	-0.383	-0.670 **	-0.163	-0.475 *	0.136
	根系	-0.754 **	0.022	-0.730 **	-0.072	-0.135	0.431
DHAA	叶片	-0.583 **	0.194	-0.609 **	0.145	0.199	0.487 *
	根系	-0.709 **	0.039	-0.711 **	0.045	-0.151	0.529 *
GSH	叶片	-0.515 *	-0.346	-0.576 **	0.079	0.016	0.403
	根系	-0.628 **	0.233	-0.438 *	0.048	-0.136	0.501 *
GSSG	叶片	-0.260	-0.360	-0.400	-0.284	-0.381	0.205
	根系	0.506 *	-0.010	0.379	-0.155	0.285	-0.441 *
APX	叶片	-0.336	-0.297	-0.677 **	-0.449 *	-0.681 **	-0.059
	根系	-0.122	-0.258	-0.166	0.453 *	-0.098	0.441 *

表 5 低温胁迫下玉米系统抗性、碳氮代谢与膜脂过氧化间相关分析

Table 5 Correlation analysis between systemic resistance, carbon-nitrogen metabolism and membrane lipid peroxidation in maize under low temperature stress

指标 Indexes	根系活力 Root activity	PAL		PPO		SS		SP	
		叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root	叶片 Leaf	根系 Root
叶片 H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content of leaf	0.011	-0.503 *	-0.591 **	-0.480 *	-0.399	-0.279	-0.184	-0.737 **	-0.622 **
叶片 GSH 含量 GSH content of leaf	-0.422	0.207	0.439 *	0.286	0.213	0.119	0.076	0.540 *	0.337
叶片 DHAA 含量 DHAA content of leaf	-0.527 *	0.309	0.608 **	0.570 **	0.496 *	0.621 **	0.418	0.157	0.508 *
叶片 SOD 活性 SOD activity of leaf	0.529 *	-0.390	-0.562 **	-0.209	-0.535 *	-0.436 *	-0.265	-0.191	-0.101
叶片 CAT 活性 CAT activity of leaf	0.608 **	-0.138	-0.198	-0.116	0.110	-0.527 *	-0.179	0.456 *	-0.031
根系 H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content of root	-0.494 *	-0.178	-0.226	-0.145	-0.211	0.011	-0.034	-0.486 *	-0.170
根系 MDA 含量 MDA content of root	-0.688 **	0.176	0.139	0.193	-0.044	0.231	-0.130	-0.143	0.256
根系 GSH 含量 GSH content of root	-0.388	0.582 **	0.448 *	0.523 *	0.177	0.306	0.044	0.201	0.640 **
根系 GSSG 含量 GSSG content of root	0.508 *	-0.708 **	-0.314	-0.543 *	-0.101	-0.271	0.089	-0.210	-0.497 *
根系 DHAA 含量 DHAA content of root	-0.468 *	0.526 *	0.542 *	0.545 *	0.310	0.432	0.054	0.371	0.547 *
根系 APX 活性 APX activity of root	-0.419	0.336	0.121	0.558 **	-0.188	-0.033	-0.195	-0.003	0.517 *

PAL: 苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase; PPO: 多酚氧化酶 Polyphenol oxidase ; SS: 可溶性糖 Soluble sugar; SP: 可溶性蛋白 Soluble protein

叶片 SS 含量与 DHAA 含量显著正相关,而与 SOD 和 CAT 活性显著负相关;叶片的 SP 与 H₂O₂ 含量显著负相关,与 CAT 活性显著负相关,而根系的 SP 与 H₂O₂ 含量显著负相关,与根系的 AsA-GSH 循环主要物质显著正相关。可见,低温胁迫下腐植酸浸种加强了幼苗氮代谢,增强了抗氧化酶系活性,从而加强了 H₂O₂ 的清除能力。

3 讨论

3.1 腐植酸浸种处理下玉米幼苗响应低温胁迫的主要诱导因子

植物在不同的非生物胁迫下都可以观察到膜损伤现象,低温胁迫首先发生在细胞膜系统^[24]。研究认为,玉米的最佳生长温度为 25—28℃,在 12℃ 以下玉米幼苗的过氧化应激基因表达上调,SOD 与 APX 活性同时提高,降低由活性氧引起的细胞离子外渗成为提高耐低温的重要特征^[25]。低温胁迫导致 SAR 积累,从而诱导 SOD 活性,转化为高浓度的 H₂O₂,进而提高了抗氧化酶系活性。本研究中腐植酸浸种对玉米幼苗抗氧化响应的主要诱导因子也是 H₂O₂而非 SAR。因为不仅幼苗的 SAR 产生速率与诱导酶 SOD 活性间相关系数显著,且系统抗性代表酶 PAL、PPO 活性及 AsA-GSH 循环主要物质含量的变化也表现为与 H₂O₂含量的显著相关性。这可能是低温胁迫下活性氧浓度超出一定范围,易使 SOD、POD 等酶失活^[26]。植物在不适的生长环境下会产生超过正常水平的活性氧^[4],研究发现在植物中 2%左右的基因表达是受 H₂O₂调控的^[27],尤其是在非生物逆境条件下 H₂O₂可以诱导许多保护酶编码基因的产生^[28-29],介导了一系列的抗性机制^[30-31]。本文中玉米幼苗叶片和根系的膜脂过氧化的主要产物 MDA 含量均与根系的 H₂O₂含量显著正相关,而与 SAR 产生速率相关不显著。综合分析,腐植酸浸种通过消除根系的 H₂O₂积累,从而减少低温胁迫对根系的质膜损伤,增强玉米幼苗对过氧化的系统响应。

3.2 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗 H₂O₂清除的主要途径

低温胁迫下 SAR 和 H₂O₂作为植株体内最主要的活性氧导致膜脂过氧化,破坏细胞膜完整性,激活抗氧化酶及抗氧化物质相关基因表达,增强植株自身活性氧清除能力是植物耐低温胁迫的主要途径^[32]。郑春芳等^[33]等研究认为低温胁迫下清除叶片 H₂O₂的 AsA-GSH 循环受到抑制,致使叶片对活性氧的清除主要依赖 SOD。但也有研究表明,由于 SOD、POD 等酶在低温条件下受活性氧积累的影响易失去活性和分解^[34],同时,CAT 对底物 H₂O₂的亲合力较低,而 AsA-GSH 循环在胞质 H₂O₂的清除中起主要作用。本文研究认为,由于腐植酸浸种对低温胁迫下 SAR 产生速率影响很小,而调控 H₂O₂的积累是加强玉米幼苗抵御低温膜质过氧化的主要途径。虽然腐植酸浸种同步提高了 CAT 和 AsA-GSH 循环活性,但 H₂O₂清除主要依靠 AsA-GSH 循环。前人研究证实,在 AsA-GSH 循环中 AsA 含量及 AsA/DHAA 比值与抗冷性呈正相关^[35-36]。此外,GSH 作为植物体内主要的抗氧化物质之一,除了直接参与活性氧的清除,还与 AsA 偶联^[37],GSH 及 GSH/GSSG 比值成为激活植物体内抗性基因的信号因子^[38]。本研究中腐植酸浸种提高了低温胁迫下玉米幼苗的 GSH、GSSG、AsA 和 DHAA 含量,但 GSH 和 GSSG 含量的增加幅度明显小于 AsA 和 DHAA 增加幅度,且浸种处理的叶片 APX 活性增加幅度均大于 50%。由此可见,低温胁迫下腐植酸浸种加强了 AsA 和 GSH 再生,提高了 AsA-GSH 循环活性而增加 H₂O₂清除能力,且以促进 AsA 合成为核心。这与低温胁迫下番茄^[39]、黄瓜^[40]、秋茄^[33]、茶树^[32]的 AsA-GSH 循环研究结果相似。腐植酸浸种增强低温胁迫下玉米幼苗抗氧化机制与外源褪黑素的作用途径一致,外施褪黑素也是通过增加 AsA 含量,提升 AsA/DHAA 比值,为 APX 提供足够的底物使 AsA 再生成,促进了 AsA-GSH 循环系统的运转^[33]。

3.3 低温胁迫下玉米幼苗对腐植酸浸种的系统响应

低温是破坏栽培植物代谢过程和细胞结构的主要环境压力之一^[10],玉米在低温(昼夜 14℃/12℃)条件下 28 h 就会发生冷应激反应,冷敏感型玉米的细胞渗透电位降低,主要与蔗糖积累降低有关^[41],而耐冷型玉米蔗糖转运蛋白和水孔蛋白含量显著增加,韧皮部转载蔗糖能力提高^[42]。本研究发现腐植酸浸种处理的玉米幼苗低温胁迫下可溶性糖含量略有增加,但与对照差异不显著,而可溶性蛋白质含量增加明显。可溶性糖向根系的运输和积累可提高根系渗透调节能力,防止膜脂过氧化,维持根系活力。但本研究中腐植酸浸种降低了植物 C/N,通过加强氮代谢,促进可溶性蛋白质合成,从而提高抗氧化酶系活性,以及 GSH 等含氮抗氧化物质含量以维系质膜完整性,保持根系活力;根系活力与抗氧化特性的相关分析也表明,根系活力与根系的 GSSG 含量显著正相关,而与 DHAA 含量显著负相关。腐植酸浸种不仅提高了低温胁迫下植株的抗氧化能

力,同步诱导了系统抗性的增强,而後者的提高又加强了前者的能力,叶片 H_2O_2 含量的降低与 PAL 和 PPO 活性的增强显著相关。腐植酸浸种增强植株对低温胁迫抗氧化响应的重要原因在于其复杂的化学结构。腐植酸作为大分子聚合物,带有羧基、酚基、酮基等活性基团,具有很强的生物活性和可变电子价位^[43],而这些特性被证明分别是海藻提取物^[44]、稀土元素^[34]能够提高低温条件下玉米抗氧化应激能力的原因。

3.4 腐植酸浸种对低温胁迫下玉米幼苗生长的影响

玉米低温胁迫下外源脱落酸灌根研究表明,PAL 和 PPO 活性的提升,既提高了幼苗的抗氧化能力,也有利于低温后的幼苗修复^[45]。本研究发现,系统抗性和氮代谢的加强是根系和叶片对腐植酸浸种的共同反应,尤其是 PAL 活性;浸种处理后根系在 SAR 和 H_2O_2 双重信号的作用下,抗氧化酶系、AsA-GSH 循环活性均得到加强;而叶片对浸种的响应主要是 AsA-GSH 循环;腐植酸浸种处理的根系鲜重显著提高,而对叶片鲜重影响较小。因此,维持根系活力、促进根系生长成为腐植酸浸种调控玉米幼苗耐低温胁迫的主要途径。比较不同浸种浓度的效果可知,大多数测定指标均表现为随浸种浓度的增加呈单峰曲线或对数曲线,其中 AsA-GSH 循环主要物质含量和酶活性的峰值出现在 1.6% 或 2.0% 浓度处理;系统抗性酶活性及 SS、SP 含量的峰值出现在 1.6% 浓度处理;但抗氧化酶活性、根系活力和鲜重的峰值出现在 0.4% 或 0.8% 浓度处理。而根系的 H_2O_2 含量在 0.8% 浓度处理时达到最低值,MDA 含量在 0.4% 浓度处理时达到最低值;同时,叶片的 H_2O_2 含量在 1.2% 浓度处理时达到最低值,MDA 含量在 0.8% 浓度处理时即达到最低值。可见,高浓度的腐植酸浸种有利于低温胁迫下玉米幼苗对活性氧的清除和系统抗性的增强,但 AsA-GSH 循环主要物质和系统抗性酶的合成是以牺牲生长为代价。植物往往以消耗更多的代谢资源用于防御系统的激活以“权衡生长与防御”^[46],但快速生长也是植物耐受逆境的一种重要方式^[47]。因此,综合分析评价膜质损伤程度、根系活力和生长质量认为,用 0.4%—0.8% 质量浓度的腐植酸浸种对提高玉米幼苗耐低温胁迫较为适宜。前人的研究发现,在土壤中施用不超过 1 g/kg 的腐植酸类物质或叶面喷施 0.1% 的腐植酸,可促进作物生长^[48]。本研究中采用 0.4%—0.8% 的腐植酸浸种可显著提高玉米耐低温能力,但试验是基于人工气候箱的水培方式进行的,对于露地生产的实践效果还有待于进一步研究。

4 结论

低温胁迫条件下腐植酸浸种主要受到 H_2O_2 积累诱导,促进了可溶性蛋白质合成,提高氮代谢水平,以消除根系的 H_2O_2 积累,减少低温胁迫对根系的质膜损伤为主要途径。通过增强 CAT 活性,促进 AsA 合成为核心,增强 AsA-GSH 循环系统的运转活性;提高 PAL、PPO 活性,增强幼苗系统抗性;维持根系活力和促进根系生长来提高玉米植株根冠比,提高玉米幼苗的抗氧化应激能力。虽然,质量浓度为 1.6%—2.0% 的腐植酸浸种处理可获得最好的 AsA-GSH 循环系统活性和系统抗性,但是以牺牲生长为代价,在本研究中 0.4%—0.8% 处理即可达到最佳的 H_2O_2 清除效果,获得最大的根系活力和鲜重,可作为水培条件下玉米种子处理的适宜浓度。

参考文献(References):

- [1] 赵俊芳, 杨晓光, 刘志娟. 气候变暖对东北三省春玉米严重低温冷害及种植布局的影响. 生态学报, 2009, 29(12): 6544-6551.
- [2] 姜丽霞, 吕佳佳, 曲辉辉, 杨晓强, 季生太, 李秀芬, 张雪梅, 王铭, 王萍. 黑龙江省玉米生长期冷害与干旱混合发生对产量的影响. 灾害学, 2019, 34(4): 6-13.
- [3] 张建平, 王春乙, 赵艳霞, 杨晓光, 王靖. 基于作物模型的低温冷害对我国东北三省玉米产量影响评估. 生态学报, 2012, 32(13): 4132-4138.
- [4] Rakhra G, Sharma A D, Singh J. Anti-oxidative potential of boiling soluble antioxidant enzymes in Amelioration of drought-induced oxidative stress in tolerant and sensitive cultivars of *Triticum aestivum*. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2015, 18(2): 103-122.
- [5] Khan T A, Fariduddin Q, Yusuf M. Low-temperature stress: is phytohormones application a remedy? Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(27): 21574-21590.
- [6] Falcone D L, Ogas J P, Somerville C R. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in

- membrane lipid composition. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 17.
- [7] Belozerskaya T A, Gessler N N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, 43(5): 506-515.
- [8] Radyukina N L, Mikheeva L E, Karbysheva E A. Low molecular weight antioxidants in cyanobacteria and plant cells. *Biology Bulletin Reviews*, 2019, 9(6): 520-531.
- [9] Shan C J, Zhang S L, Ou X Q. The roles of H_2S and H_2O_2 in regulating AsA-GSH cycle in the leaves of wheat seedlings under drought stress. *Protoplasma*, 2018, 255(4): 1257-1262.
- [10] Oláh C, Ludmerszki E, Rácz I, Balassa G, Rudnóy S. S-methylmethionine-salicylate pretreatment reduces low temperature stress in maize. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2018, 65(1): 63-68.
- [11] da Cruz R P, Golombieski J I, Bazana M T, Cabreira C, Silveira T F, da Silva L P. Alterations in fatty acid composition due to cold exposure at the vegetative stage in rice. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2010, 22(3): 199-207.
- [12] Ohnishi S, Miyoshi T, Shirai S. Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 69(1): 56-62.
- [13] 王培娟, 霍治国, 杨建莹, 吴霞. 基于热量指数的东北春玉米冷害指标. *应用气象学报*, 2019, 30(1): 13-24.
- [14] Liu Y, Zhi L L, Zhou S Q, Xie F. Effects of mercury binding by humic acid and humic acid resistance on mercury stress in rice plants under high Hg/humic acid concentration ratios. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(15): 18650-18660.
- [15] 申洁, 卫林颖, 郭美俊, 王玉国, 原向阳, 郭平毅. 腐植酸对干旱胁迫下谷子萌发的影响. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 2019, 39(6): 26-33.
- [16] 郭伟, 王庆祥. 腐植酸浸种对盐碱胁迫下小麦幼苗抗氧化系统的影响. *应用生态学报*, 2011, 22(10): 2539-2545.
- [17] 郭伟, 于立河. 腐植酸浸种对盐胁迫下小麦萌发种子及幼苗生理特性的影响. *麦类作物学报*, 2012, 32(1): 90-96.
- [18] 程扶玖, 杨道麒, 吴庆生. 腐植酸对小麦抗旱性的生理效应. *应用生态学报*, 1995, 6(4): 363-367.
- [19] 刘伟, 刘景辉, 萨如拉, 王占海, 苏文楠. 腐植酸水溶肥料对燕麦叶片保护酶活性和渗透物质的影响. *灌溉排水学报*, 2014, 33(1): 107-109.
- [20] 庞春花, 贺笑, 张永清, 华艳宏, 康书瑜. 氮肥与腐殖酸配施对藜麦根系抗旱生理效应及产量的影响. *干旱区资源与环境*, 2019, 33(3): 184-188.
- [21] 张小冰, 邢勇, 郭乐, 张彩凤. 腐植酸钾浸种对干旱胁迫下玉米幼苗保护酶活性及 MDA 含量的影响. *中国农学通报*, 2011, 27(7): 69-72.
- [22] 刘萍, 李明军. 植物生理学实验技术. 北京: 科学出版社, 2007.
- [23] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999.
- [24] Hill W, Jin X L, Zhang X H. Expression of an arctic chickweed dehydrin, CarDHN, enhances tolerance to abiotic stress in tobacco plants. *Plant Growth Regulation*, 2016, 80(3): 323-334.
- [25] Li M, Lin L, Zhang Y H, Sui N. ZmMYB31, a R2R3-MYB transcription factor in maize, positively regulates the expression of CBF genes and enhances resistance to chilling and oxidative stress. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(4): 3937-3944.
- [26] Kitajima S. Hydrogen peroxide - mediated inactivation of two chloroplastic peroxidases, ascorbate peroxidase and 2-Cys peroxiredoxin. *Photochemistry and Photobiology*, 2008, 84(6): 1404-1409.
- [27] Morsy M R, Jouve L, Hausman J F, Hoffmann L, Stewart J M. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(2): 157-167.
- [28] 李瑞雪, 金晓玲, 胡希军, 汪结明, 罗峰, 张方静. 低温胁迫下 6 种木兰科植物的生理响应及抗寒相关基因差异表达. *生态学报*, 2019, 39(8): 2883-2898.
- [29] Guler N S, Pehlivan N. Exogenous low-dose hydrogen peroxide enhances drought tolerance of soybean (*Glycine Max* L.) through inducing antioxidant system. *Acta Biologica Hungarica*, 2016, 67(2): 169-183.
- [30] Li Z G, He Q Q. Hydrogen peroxide might be a downstream signal molecule of hydrogen sulfide in seed germination of mung bean (*Vigna radiata*). *Biologia*, 2015, 70(6): 753-759.
- [31] Riva-Roveda L, Escalé B, Giauffret C, Périlleux C. Maize plants can enter a standby mode to cope with chilling stress. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 212.
- [32] Li J H, Arkorful E, Cheng S Y, Zhou Q Q, Li H, Chen X, Sun K, Li X H. Alleviation of cold damage by exogenous application of melatonin in vegetatively propagated tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientia Horticulturae*, 2018, 238: 356-362.
- [33] 郑春芳, 刘伟成, 魏龙, 陈继浓, 张呈念, 仇建标, 丁文勇, 郑青松. 外施褪黑素对低温胁迫下红树植物秋茄光合作用和抗坏血酸-谷胱甘肽循环的调控. *植物生理学报*, 2019, 55(8): 1211-1221.

- [34] Wang Y, Zhou M, Gong X L, Liu C, Hong M M, Wang L, Hong F S. Influence of lanthanides on the antioxidative defense system in maize seedlings under cold stress. *Biological Trace Element Research*, 2011, 142(3): 819-830.
- [35] Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam M M, Fujita M. Exogenous spermidine alleviates low temperature injury in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings by modulating ascorbate-glutathione and glyoxalase pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 30117-30132.
- [36] Zhang Y P, Xu S, Yang S J, Chen Y Y. Melatonin alleviates cold-induced oxidative damage by regulation of ascorbate-glutathione and proline metabolism in melon seedlings (*Cucumis melo* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2017, 92(3): 313-324.
- [37] Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee T I, Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(2): 249-268.
- [38] Pukacka S, Ratajczak E. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163(12): 1259-1266.
- [39] 韩敏, 曹逼力, 刘树森, 徐坤. 低温胁迫下番茄幼苗根穗互作对其抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响. *园艺学报*, 2019, 46(1): 65-73.
- [40] Zhao H L, Ye L, Wang Y P, Zhou X T, Yang J W, Wang J W, Cao K, Zou Z R. Melatonin increases the chilling tolerance of chloroplast in cucumber seedlings by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate-glutathione cycle. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1814.
- [41] Bilska-Kos A, Solecka D, Dziewulska A, Ochodzki P, Jończyk M, Bilski H, Sowiński P. Low temperature caused modifications in the arrangement of cell wall pectins due to changes of osmotic potential of cells of maize leaves (*Zea mays* L.). *Protoplasma*, 2017, 254(2): 713-724.
- [42] Bilska-Kos A, Grzybowski M, Jończyk M, Sowiński P. In situ localization and changes in the expression level of transcripts related to intercellular transport and phloem loading in leaves of maize (*Zea mays* L.) treated with low temperature. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(5): 123.
- [43] Zandonadi D B, Matos C R R, Castro R N, Spaccini R, Olivares F L, Canellas L P. Alkamides; a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2019, 6(1): 23.
- [44] Bradáčová K, Weber N F, Morad-Talab N, Asim M, Imran M, Weinmann M, Neumann G. Micronutrients (Zn/Mn), seaweed extracts, and plant growth-promoting bacteria as cold-stress protectants in maize. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2016, 3(1): 19.
- [45] Tian L X, Li J. The effects of exogenous ABA applied to maize (*Zea mays* L.) roots on plant responses to chilling stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40(4): 77.
- [46] Cui C, Wang J J, Zhao J H, Fang Y Y, He X F, Guo H S, Duan C G. A *Brassica* miRNA regulates plant growth and immunity through distinct modes of action. *Molecular Plant*, 2020, 13(2): 231-245.
- [47] Chandrasekhar C, Ray J G. Lead accumulation, growth responses and biochemical changes of three plant species exposed to soil amended with different concentrations of lead nitrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 26-36.
- [48] Khaled H, Fawy H A. Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth, and soil properties under conditions of salinity. *Soil and Water Research*, 2011, 6(1): 21-29.