

李贤, 杨莲, 吴凤芝. 褪黑素对低温胁迫下番茄多胺代谢及耐冷基因表达的影响 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (7): 855–868.

LI X, YANG L, WU F Z. Effects of Melatonin on Tomato Polyamine Metabolism and Cold Tolerance Gene Expression under Low Temperature Stress [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (7): 855–868.

褪黑素对低温胁迫下番茄多胺代谢及耐冷基因表达的影响

李 贤, 杨 莲, 吴凤芝*

(东北农业大学园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:【目的】探讨低温胁迫下褪黑素如何调节番茄幼苗多胺代谢, 以及对番茄耐冷基因表达的影响, 揭示褪黑素缓解番茄低温胁迫的机制。【方法】以番茄东农 708 为试验材料, 采用叶片喷施的方法, 研究不同浓度 (50、100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 褪黑素对番茄幼苗生长、多胺代谢以及耐冷基因表达的影响; 并通过腐胺 (Put) 合成抑制剂与褪黑素联合预处理进行验证, 分析抑制剂对低温胁迫下褪黑素诱导番茄多胺含量和抗氧化酶活性的影响。【结果】褪黑素预处理缓解了低温胁迫对番茄幼苗生长的抑制, 显著提高了番茄株高、鲜/干质量及低温处理各时段番茄叶片中 Put 含量, 而亚精胺 (Spd) 和精胺 (Spm) 含量仅在低温处理第 2 天显著增加, 精氨酸 (Arg) 含量和精氨酸脱羧酶 (ADC) 活性及 ADC 合成相关基因表达水平也显著高于单独低温处理, Put 分解酶二胺氧化酶 (DAO) 活性与基因表达水平显著降低, 验证试验发现低温胁迫下 Put 的精氨酸途径抑制剂显著降低了褪黑素诱导的 Put 积累和抗氧化酶活性, 阻碍了褪黑素对细胞膜的保护作用。同时, 褪黑素提高了低温胁迫下番茄叶片内与 Put 相关的耐冷基因表达水平。【结论】褪黑素可正向调节精氨酸介导的 Put 合成途径并抑制 Put 分解来增加 Put 的积累, 褪黑素通过精氨酸介导的 Put 积累提高番茄的抗氧化防御和耐冷基因的表达, 从而增强番茄幼苗对低温胁迫的耐受性。

关键词: 番茄; 褪黑素; 低温胁迫; 多胺代谢; 耐冷基因

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 07-0855-14

Effects of Melatonin on Tomato Polyamine Metabolism and Cold Tolerance Gene Expression under Low Temperature Stress

LI Xian, YANG Lian, WU Fengzhi*

(College of Horticulture and Landscape, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: 【Objective】 Polyamine metabolism and expression of cold tolerance genes associated with the mechanism of melatonin in alleviating low temperature stress in tomato were investigated. 【Method】 Solutions of melatonin in the concentrations of 50, 100, 200, and 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were sprayed on the leaves of Dongnong 708 tomato plants (*Solanum lycopersicum*). Under low temperature, optimal concentration of melatonin for the stress alleviation was determined according to the malondialdehyde content and electrolyte leakage rate in the leaves. Effects of the treatment on the growth, polyamine metabolism, and cold tolerance gene expression, as well as those of putrescine (Put) synthesis inhibitor and melatonin pretreatment on polyamine content and antioxidant characteristics, of the plants were determined. 【Result】 Pretreating the tomato plans with melatonin prior to low temperature exposure lessened the seedling growth retardation induced by the stress. The plant height and fresh/dry weights as well as the Put in leaf at all stages of the stress imposition were significantly increased. The contents of spermidine (Spd) and spermine (Spm) rose significantly on the 2nd day after low temperature treatment before tapering off. The arginine (Arg) content, arginine decarboxylase (ADC) activity, and ADC synthesis-related gene expressions became significantly higher with the melatonin pretreatment, while the Put catabolic enzyme diamine oxidase (DAO) activity and gene expression significantly declined. A challenge test confirmed that, under low temperature stress, the Put synthesis inhibitor in the arginine pathway significantly reduced the melatonin-induced enhancements on Put accumulation

收稿日期: 2022-05-07 初稿; 2022-06-06 修改稿

作者简介: 李贤 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 设施蔬菜生理生态 (E-mail: 3326691801@qq.com)

* 通信作者: 吴凤芝 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 设施蔬菜生理生态 (E-mail: fzwu2006@aliyun.com)

and antioxidant enzyme activity, which would otherwise provide a protective effect on the cell membrane. Additionally, the expression of cold tolerance genes related to Put in tomato leaves was upregulated with the presence of melatonin.

【Conclusion】 Melatonin positively regulated the accumulation, but inhibited the degradation, of Put mediated by arginine. The arginine mediated Put synthesis pathway played an important role in the antioxidant defense of the tomato plants improved by melatonin. In addition, melatonin might also increase the expression of cold tolerance genes by way of promoting the Put synthesis to further boost the cold tolerance of tomato seedlings.

Key words: Tomatos; melatonin; low temperature stress; polyamine metabolism; cold tolerance gene

0 引言

【研究意义】番茄 (*Solanum lycopersicum*) 作为一种重要的蔬菜作物, 喜温, 对低温极其敏感, 当环境温度低于 12 °C 时易遭受冷害^[1]。在中国北方地区, 低温是越冬栽培的主要逆境, 严重抑制番茄的生长发育^[2]。因此, 提高番茄的低温耐受性对番茄的生产具有重要意义。【前人研究进展】前人研究发现褪黑素和多胺在调节植物抗逆过程中有着相似的作用, 另外胁迫环境下褪黑素还可以调控植物体内的多胺代谢。在干旱胁迫下褪黑素通过调节多胺代谢相关酶活性和基因表达水平, 从而增强番茄耐热性^[3]。Gong 等^[4] 研究发现, 在碱性环境中, 经褪黑素处理的苹果植株中多胺合成酶 ADC 基因表达量提高, 内源 Put、Spd 和 Spm 的积累量增多, 电解质渗漏率降低, 减轻了细胞膜损伤。张贵友等^[5] 发现褪黑素提高低温环境下烟草细胞 ADC 的活性, 促进 Put 的合成来提高烟草悬浮细胞存活率。而 Ke 等^[6] 研究表明, 盐胁迫下褪黑素通过抑制小麦叶片中多胺分解酶 DAO 和 PAO 活性, 提高了 Spd 和 Spm 含量, 降低了 Put 含量, 有利于清除活性氧。这些结果表明, 在不同植物中褪黑素通过调节多胺代谢, 诱导不同种类多胺的积累, 提高植物对胁迫的抗性^[7]。

【本研究切入点】低温胁迫下, 褪黑素对番茄幼苗多胺代谢的影响如何? 褪黑素主要通过影响哪种多胺来增强番茄耐冷性? 该多胺主要通过哪条途径合成的? 尚不完全清楚。除此之外, 前人研究发现在拟南芥和西瓜等植物中褪黑素能诱导 C2H2 型锌指转录因子基因、*AtCOR15* 以及热激蛋白基因 (*HSEs*) 等耐冷基因的表达, 提高植物低温胁迫耐受性^[8-10], 在番茄响应低温胁迫时, ICE-CBF-COR 信号转导通路基因 (*SIICE1*、*SICBF1*、*SICBF3* 和 *SICOR413*)、MAPK 激酶 (*SIMAPK3*、*SIZAT12*) 表达水平的上调, 对提高番茄植株耐寒性具有重要意义。然而褪黑素是否可以通过提高番茄 ICE-CBF-COR 信号转导通路基因 (*SIICE1*、*SICBF1*、*SICBF3* 和 *SICOR413*)、

MAPK 激酶 (*SIMAPK3*、*SIZAT12*) 的表达来响应低温胁迫增强番茄幼苗耐寒性尚不完全清楚。【拟解决的关键问题】以低温敏感型番茄品种东农 708 为试验材料, 采用褪黑素预处理的方法, 分析低温胁迫下番茄幼苗生长、多胺代谢相关指标以及耐冷基因表达的变化; 并施用腐胺合成抑制剂, 分析其对褪黑素诱导的番茄叶片中多胺含量、膜脂过氧化损伤以及抗氧化酶活性的影响。通过研究明确褪黑素如何对低温胁迫下番茄幼苗多胺代谢进行调控以及褪黑素对低温胁迫下番茄叶片耐冷基因表达的影响, 以期进一步揭示褪黑素增强番茄幼苗耐冷性的机制, 为褪黑素在生产上的应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2019 年 5—12 月进行。试验材料为东农 708 番茄品种 (由东北农业大学番茄研究所提供), 褪黑素 (MT)、腐胺 (Put)、Put 合成抑制剂 D-精氨酸 (D-Arg) 和二氟甲基鸟氨酸 (DFMO), 均购买自上海源叶生物技术公司。

1.1.1 褪黑素浓度筛选 将番茄种子于 55 °C 下浸种消毒 20 min 后, 置于恒温培养箱中催芽, 种子露白后在智能人工气候植物培养箱 (HPG-280HG) 中播种于育苗盘内, 培养条件: 温度昼 25 °C/夜 18 °C (常温), 光照强度 20000 lx, 光周期昼 14 h/夜 10 h, 空气湿度 70%。幼苗长至 2 片真叶时分苗于塑料盆中 (10 cm×10 cm)。待幼苗长至 4 叶 1 心时, 分别用蒸馏水 (CK) 和浓度为 50、100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源 MT 于培养箱为黑夜条件时喷施于番茄叶片, 以叶片滴水为度, 每天喷 1 次, 连续喷 5 d 后^[11], 将番茄幼苗转至另一培养箱进行低温胁迫处理 (昼 15 °C/夜 10 °C), 培养箱除温度设置改变外, 其他参数保持不变。试验设 6 个处理: ①蒸馏水处理后常温处理 (CK); ②蒸馏水处理后低温 (C); ③50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素处理后低温处理 (C+MT1); ④100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素喷施后置于昼 15 °C/夜 10 °C (C+MT2);

⑤200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素预喷施后置于昼 15 $^{\circ}\text{C}$ /夜 10 $^{\circ}\text{C}$ (C+MT3); ⑥300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素喷施后置于昼 15 $^{\circ}\text{C}$ /夜 10 $^{\circ}\text{C}$ (C+MT4)。在低温处理的第 0、2、4、8 天采集番茄叶片, 参考 Li^[12] 的方法, 根据番茄叶片 MDA 含量和电解质渗漏率筛选出缓解番茄植株膜损伤效果最佳的褪黑素浓度用于后续试验。

1.1.2 褪黑素对低温胁迫下番茄多胺代谢的影响

番茄幼苗的培育和褪黑素 (浓度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的处理方式及时间同褪黑素浓度筛选试验, 试验设计 4 个处理: ①常温对照 (CK); ②常温下褪黑素处理 (MT); ③低温处理 (C); ④褪黑素预处理后进行低温处理 (C+MT)。在低温处理的第 0、2、4、6、8 天进行番茄叶片取样, 用于测定多胺代谢相关指标 (多胺和前体物质含量、合成和分解酶活性及基因表达量); 在低温处理的第 8 天, 测定番茄幼苗的生长指标。

为了探究低温胁迫下褪黑素通过哪条途径诱导 Put 的合成, 以及 Put 是否在褪黑素提高番茄幼苗耐冷性中起重要作用, 选用 Put 合成抑制剂: 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-精氨酸 (D-Arg, 抑制精氨酸途径) 和二氟甲基鸟氨酸 (DFMO, 抑制鸟氨酸途径)^[13]。试验共设 5 个处理: ①常温处理 (CK); ②低温处理 (C); ③褪黑素预处理后低温处理 (C+MT); ④早上 6:00 用 D-Arg 预处理 12 h 后用褪黑素处理, 联合处理 5 d 后低温处理 (C+D-Arg+MT); ⑤早上 6:00 用 DFMO 处理, 12 h 后用褪黑素处理, 联合处理 5 d 后低温处理 (C+DFMO+MT)。未经抑制剂处理的组 (①-③) 在同一时间喷施蒸馏水或褪黑素。在低温处理的第 4 天进行番茄叶片取样, 测定多胺含量、MDA 含量、电解质渗透率和抗氧化酶活性。

1.1.3 褪黑素对低温胁迫下番茄耐冷基因表达的影响

试验设计及褪黑素处理方式同 1.1.2, 褪黑素预处理后进行 5 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理, 在低温处理的第 0、1、3、6、12 和 24 h 选取番茄幼嫩叶片取样, 分析 *SIMAPK3*、*SIICE1*、*SICBF1*、*SICBF3*、*SICOR413* 和 *SIZAT12* 基因的表达情况。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 丙二醛含量和电解质渗漏率的测定 采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量^[14]; 电解质渗透率的测定参考 Ishitani 等^[15] 的方法。

1.2.2 生长指标的测定 用直尺测量番茄植株茎基部到生长点的长度作为株高, 然后用清水将植株洗干净, 擦干水分后将植株地上部和地下部分开, 用

电子天平称量鲜质量; 然后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重后称量干质量。

1.2.3 抗氧化酶活性的测定 配制磷酸缓冲溶液, 作为番茄中的抗氧化酶的提取液, 缓冲溶液由 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.8)、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 二钠盐和 2% (m/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 组成。称取 0.3 g 番茄叶片于研钵中, 加入 5 mL 预冷的磷酸缓冲溶液, 在冰浴中快速研磨成匀浆, 然后转移至 10 mL 离心管中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 (15 000 g, 25 min)。取上清液用于测定抗氧化酶活性, SOD 酶活性参考 Giannopotitis^[16] 的方法进行测定; POD 活性根据 Nickel^[17] 的方法进行测定; CAT 活性按照 Dhindsa 等^[18] 的方法测定; APX 活性的测定参考 Pinhero^[19] 的方法, 略有改动。

1.2.4 多胺含量的测定 多胺含量的测定方法参考 Duan 等^[20] 的方法, 略作修改。番茄叶片中的多胺用 5% 高氯酸 (HClO_4) 提取, 经苯甲酰氯衍生化后用乙醚萃取, 多胺的分离采用高效液相色谱法, 色谱柱采用 C18 液相色谱柱 (Hypersil BDS C18, 4.0 \times 150 mm, 5 μm), 检测器为 Waters 2998 紫外检测器, 检测波长为 254 nm, 流动相为 V (甲醇):V (水)=3:2, 流速保持 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2.5 多胺合成酶活性测定 参考 Zhao 等^[21] 的方法测定番茄叶片中多胺合成酶活性, 略作修改。番茄叶片在预冷的磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中研磨, 离心所得的上清液为酶提取液, 取酶提取液, 与 L-精氨酸 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定 ADC 酶活性)、L-鸟氨酸 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定 ODC 酶活性) 或 S-腺苷甲硫氨酸 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定 SAMDC 活性) 进行反应, 离心后上清液用苯甲酰氯衍生, 衍生产物用乙醚萃取, 收集乙醚相吹干并溶于甲醇中, 然后检测 254 nm 处的 OD 值。

1.2.6 多胺分解酶活性测定 参考 Su^[22] 的方法测定番茄叶片中多胺分解酶活性。配制磷酸缓冲液 (pH 6.5), 用于提取番茄叶片中的酶, 取酶提取液, 加入辣根过氧化物酶溶液 (250 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和显色液 (10 mg 4-氨基氨基吡啶和 25 μL N, N-二甲基苯胺), 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 5 min, 加入 Put (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定 DAO 活性) 或 Spd+Spm (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定 PAO 活性), 测定 555 nm 处连续的 OD 值, 以每分钟 OD 值变化 0.001 为 1 个酶活力单位。

1.2.7 多胺合成前体物质含量测定 采用异硫氰酸苯酯 (PITC) 衍生法^[23] 分析番茄叶片中多胺前体物质精氨酸、鸟氨酸和甲硫氨酸的含量。取番茄叶

片, 在液氮中快速研磨成粉末, 然后加入 HCl 进行提取, 4 ℃ 下离心 30 min 后取上清液进行衍生, 衍生液由三乙胺、乙腈和异硫氰酸苯酯溶液组成, 混合液在室温下静置 1 h, 然后加入正己烷进行萃取, 收集下层清液用于高效液相色谱-紫外检测分析, 波长为 254 nm, 色谱柱采用 ACE Excel SuperC18 5 μm 4.6×250 mm 色谱柱, 进样量 20 μL, 流动相 A 为 50 mmol·L⁻¹V (乙酸钠) (用乙酸调节 pH 至 6.5) : V (乙腈) = 93:7, 流动相 B 为 V (乙腈) : V (水) = 4:1, 梯度洗脱, 洗脱程序如表 1 所示。

表 1 多胺合成前体物质检测流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase elution for detection of polyamine synthesis precursors

时间 Time/min	A/%	B/%	流速 Elution velocity/ (mL·min ⁻¹)
0	100	0	1
4	96	4	1
13	85	10	1
25	60	40	1
30	60	40	1

1.2.8 基因表达量的测定 用 Trizol 试剂提取番茄叶片总 RNA, 然后用反转录试剂盒合成 cDNA, 基因特异引物 (表 2) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。在 Analytic jena 荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应, 采用 2^{-ΔΔt} 法计算基因的相对表达量。

1.3 数据分析

使用 SPSS 软件分析数据, 方差分析采用 Turkey's HSD, 在 $P < 0.05$ 水平下进行分析, 使用 Origin 2017 绘图。

2 结果与分析

2.1 褪黑素对低温胁迫下番茄膜脂过氧化损伤和生长的影响

如图 1 所示, 与对照相比, 低温胁迫下番茄幼苗叶片中 MDA 含量和电解质渗漏率显著提高 ($P < 0.05$), 而 MTx 预处理不同程度地降低了 MDA 含量和电解质渗漏率, 当褪黑素浓度为 100 μmol·L⁻¹ 时上述两个指标降低幅度最大, 且显著低于单独低温处理 ($P < 0.05$), 因此选用 100 μmol·L⁻¹ 的 MT 进行后续试验。如表 3 所示, 常温下 MT 处理对番茄幼苗的生长无影响, 低温胁迫下番茄幼苗的株高、地上部鲜质量和干质量、地下部鲜质量和干质量以及全株鲜重和干重显著低于对照 ($P < 0.05$); 与低温胁迫

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 Primer sequences used in qRT-PCR

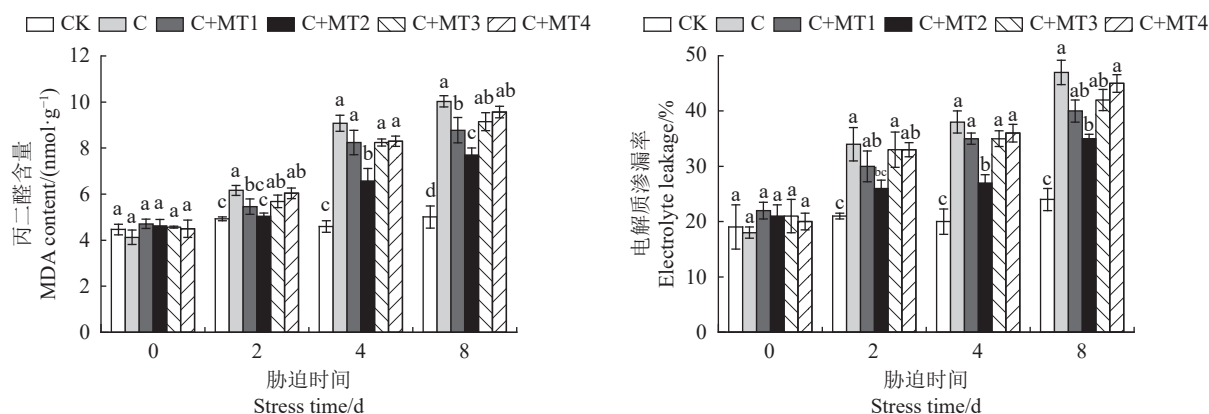
基因 Gene	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer
<i>SLADC1</i>	CATCCAGTGATTGCGAGCA	GTA AAC CACCCGAAGATGGC
<i>SLADC2</i>	GTCGGATATGGCCTTCAGGA	CTTCACGTTCTTCCGGTCAC
<i>SIODC1</i>	GCTCAACTCGGAATGCCAAA	CTCAGGGAAGTCGTGGAAGT
<i>SIODC2</i>	GGAGCATTGCCGAAGAAAT	TCGCTTGGCGATAAATGGTG
<i>SISAMDC1</i>	CCGAGTCTAGCCTCTCGTT	AAATGAAGCTCCCACGGGTA
<i>SISAMDC2</i>	AAACTCTTAGGCCCTGGCT	AGGCTGGACTCTGAAAGGAC
<i>SIDAO</i>	ATGATAGCCGCTAGACTT	CCCTACTCCCAAGTTACCA
<i>SIPA0</i>	CCTCTGTGATCATCGTCGGA	CTACTCCGCCGAATTCCTCT
<i>SIICE1</i>	TGGAAGGAAAAGCGTGAAC	AACACATCCAACACAAACCC
<i>SCBF1</i>	AGTCGGAGGAAGAAGATCAGTG	TCCATTTTCAGTACATTGAGGTG
<i>SICBF3</i>	GGCAATTCATCTGAGTGTCTG	TTGATCTTCTGTCCATCTCTCC
<i>SICOR413</i>	ATTGATGTAAGTGGAGAGAT	AACTGCAGTAGGAGCTTGT
<i>SIMAPK3</i>	AGCATTAGCTCATCCCTACCTC	GCTCTTCTCTATCCCTTGTGTG
<i>SIZAT12</i>	GCCATCGAACGAGTCATAAATC	CCTGACCCATAGAAAATCCAT
<i>Actin</i>	TGGTCGGAATGGGACAGAAG	CTCAGTCAGGAGAACAGGGT

迫相比, 低温胁迫下 MT 预处理显著提高了番茄植株的上述生长指标 ($P < 0.05$)。

2.2 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺代谢的影响

2.2.1 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺及前体物质含量的影响 如图 2 所示, 常温下 MT 处理对 3 种多胺的含量无影响; 与对照相比, 低温胁迫初期 (第 2 天) 番茄叶片中 3 种多胺以及前体物质 Arg 与 Met 的含量显著增加, 第 4~6 天 Spd、Spm 和 Met 含量显著降低 ($P < 0.05$); 低温胁迫下 MT 预处理的番茄叶片中 Put 与 Arg 含量在所有时期显著高于低温处理, Spd、Spm 和 Met 含量仅在第 2 天差异显著 ($P < 0.05$), 表明低温胁迫下 MT 预处理主要提高了低温胁迫下番茄叶片中 Put 和 Arg 的含量。

2.2.2 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺合成酶活性的影响 如图 3 所示, 与对照相比, 低温胁迫下番茄叶片中的 ADC 活性在整个低温处理期间显著提高, ODC 和 SAMDC 活性在第 2 天显著提高, SAMDC 在第 4~6 天显著降低 ($P < 0.05$); 低温胁迫下 MT 预处理进一步提高了番茄叶片中 ADC 活性, 且在各时期差异均显著, 而 ODC 活性无明显变化, SAMDC 活性仅在第 2 天差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。从低温胁迫下经 MT 预处理的番茄叶片中多胺合成酶和前体物质含量的变化情况可初步推测在 Put 的两条



CK: 常温对照处理; C: 低温处理; C+MT1-4 分别为: 50、100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素预处理后进行低温处理。柱子上方不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

CK: Control under normal temperature; C: Cold treatment; C+MT1-4: 50, 100, 200, and 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ melatonin pretreatments, respectively, prior to low temperature exposure. Data with different lowercase letters on top of column indicate significant difference at $p < 0.05$. Same for below.

图 1 褪黑素对低温胁迫下番茄幼苗叶片 MDA 含量和电解质渗漏率的影响

Fig. 1 Effects of melatonin on MDA content and electrolyte leakage in tomato leaves under low temperature stress

表 3 褪黑素对低温胁迫下番茄幼苗生长的影响

Table 3 Effects of melatonin spray on growth of tomato seedlings under low temperature stress

处理	株高	地上部鲜质量	地上部干质重	地下部鲜质量	地下部干质量	全株鲜质量	全株干质量
Treatment	Plant height/cm	Shoot fresh matter/g	Shoot dry matter/g	Root fresh matter/g	Root dry matter/g	Whole plant fresh matter/g	Whole plant dry matter/g
CK	16.49±0.32 a	7.15±0.15 a	0.91±0.03 a	2.50±0.16 a	0.45±0.02 a	9.65±0.30 a	1.36±0.05 a
MT	16.54±0.45 a	7.41±0.35 a	0.90±0.03 a	2.43±0.24 a	0.47±0.02 a	9.84±0.53 a	1.38±0.01 a
C	13.89±0.36 c	4.73±0.16 c	0.68±0.06 c	1.34±0.18 c	0.33±0.01 c	6.07±0.19 c	1.01±0.06 c
C+MT	15.12±0.28 b	5.82±0.38 b	0.80±0.03 b	1.89±0.10 b	0.39±0.01 b	7.71±0.48 b	1.19±0.04 b

CK: 常温处理; MT: 常温下 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素处理; C: 低温处理; C+MT: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素预处理后进行低温处理。表中不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

CK: Control under normal temperature; MT: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ melatonin treatment at normal temperature; C: Cold treatment; C+MT: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ melatonin pretreatment prior to low temperature exposure. Data with different lowercase letters on top of column indicate significant difference at $P < 0.05$. Same for below.

合成途径中, 精氨酸途径可能是 MT 诱导的番茄叶片中 Put 合成的主要途径。

2.2.3 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺合成酶基因表达的影响 如图 4 所示, 与对照相比, 低温胁迫显著提高了所有时期番茄叶片中 *SIADC1* 与 *SIADC2* 的相对表达量, *SISAMDC1* 基因表达量在第 2 天显著提高, 第 4~6 天显著降低, *SISAMDC2* 基因表达量在第 4~8 天显著降低 ($P < 0.05$); MT 预处理进一步提高了 *SIADC1* 与 *SIADC2* 的相对表达量, 且在低温处理的各时期差异均显著, *SISAMDC1* 的相对表达量在第 2 天差异达到显著水平, 其余时期差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.4 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺分解酶活性及其基因表达的影响 如图 5 所示, 对照和常温下 MT 处理的番茄叶片中 DAO 和 PAO 活性较稳定; 低温胁迫显著提高了番茄叶片 DAO 和 PAO 活性及基因相对表达量 (*SIDAO* 和 *SIPAO*), 且随着低温处理

时间的延长呈升高趋势 (除了第 8 天的 PAO) ($P < 0.05$); MT 预处理显著抑制了低温胁迫下 DAO 活性和 *SIDAO* 相对表达量的升高, 且在低温处理的各时期差异均达到显著水平, 而对 PAO 活性及 *SIPAO* 相对表达量无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.3 腐胺合成抑制剂对褪黑素诱导的番茄叶片多胺含量和抗氧化特性的影响

为了进一步探究低温胁迫下 MT 诱导的番茄叶片中 Put 的合成主要通过哪条途径, 以及探究 Put 是否介导了 MT 对番茄幼苗抗氧化特性的增强作用, 选用两种 Put 合成抑制 D-Arg (抑制精氨酸途径) 和 DFMO (抑制鸟氨酸途径) 进行研究。

2.3.1 腐胺合成抑制剂对褪黑素诱导的番茄叶片多胺含量的影响 如图 6 所示, 低温胁迫下 MT 预处理能显著提高番茄叶片中 Put 的含量, 采用精氨酸脱羧酶抑制剂 D-Arg 与褪黑素联合预处理, 番茄叶片中 Put 含量显著低于 MT 预处理的植株, Spd 和 Spm 含

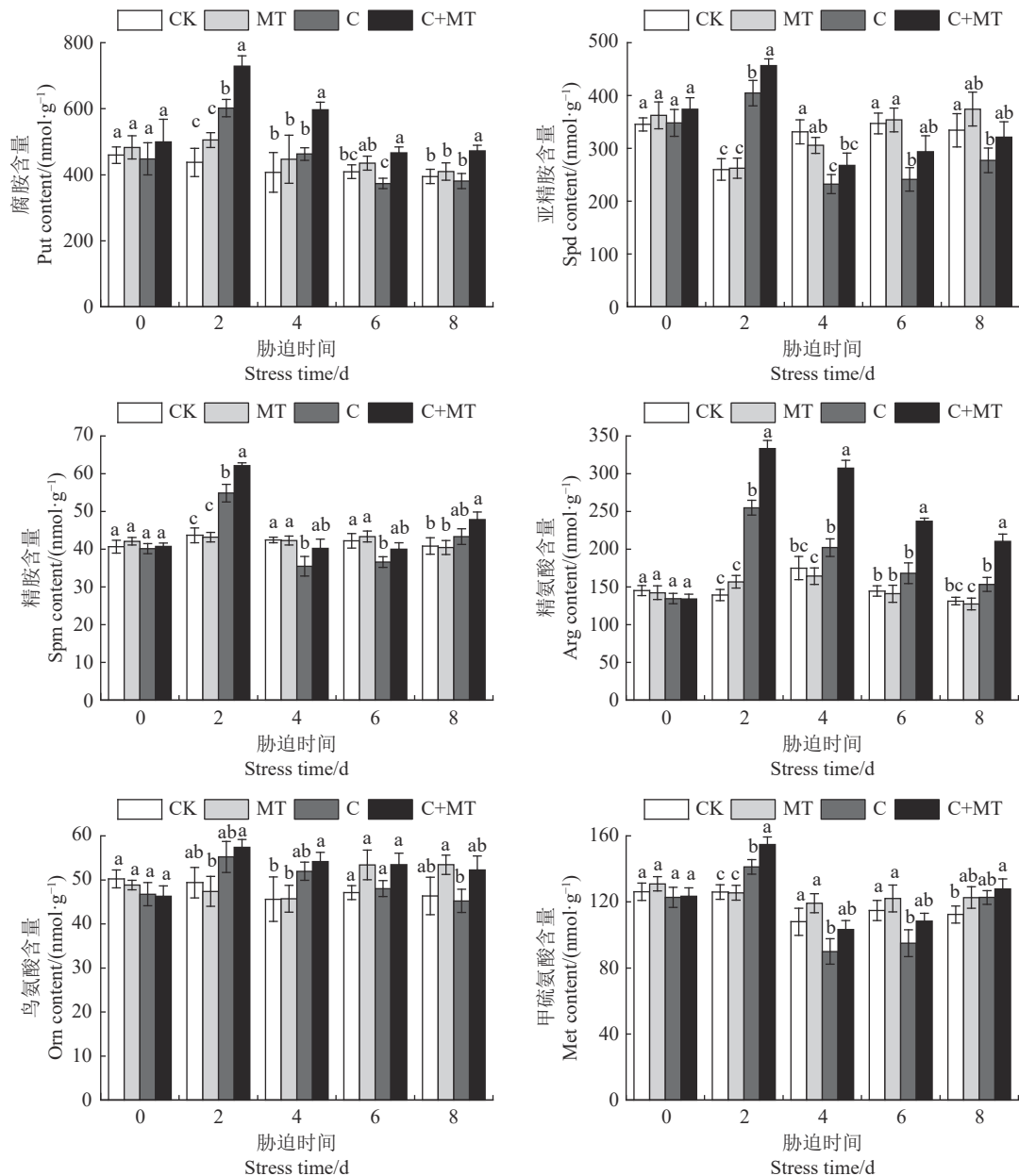


图 2 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺和前体物质含量的影响

Fig. 2 Effects of exogenous melatonin on polyamine and polyamine synthesis precursors in tomato leaves under low temperature stress

量也显著降低 ($P < 0.05$); 而采用鸟氨酸脱羧酶抑制剂 DFMO 与褪黑素联合预处理, MT 诱导的 Put 含量不变。说明低温胁迫下 MT 诱导的番茄叶片中 Put 的合成主要通过精氨酸途径。

2.3.2 腐胺合成抑制剂对褪黑素诱导的番茄叶片膜脂过氧化损伤和抗氧化酶活性的影响 如图 7 所示, 低温胁迫下 MT 预处理的番茄叶片中 MDA 含量和电解质渗漏率显著低于低温处理, SOD、POD、CAT 和 APX 活性显著高于低温处理, 然而与低温胁迫下 MT 预处理相比, D-Arg 与 MT 联合预处理 MDA 含量、电解质渗漏率显著提高, 抗氧化酶活性显著降

低 ($P < 0.05$), 恢复至单独低温处理的水平, 而 DFMO 与 MT 联合预处理上述指标没有显著变化。

上述 2.2 和 2.3 的结果表明低温胁迫下 MT 通过正向调节 Arg 途径促进番茄叶片中 Put 合成, 以及下调 Put 分解酶 DAO 基因表达, 抑制 DAO 活性, 从而促使 Put 积累, 清除细胞过量 ROS, 减轻番茄植株所受的膜脂过氧化损伤。

2.4 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片耐冷基因表达的影响

如图 8 所示, 低温胁迫诱导了番茄叶片中耐冷基因的表达, 其中 *SIICE1* 和 *SICBF3* 在低温处理 1 h

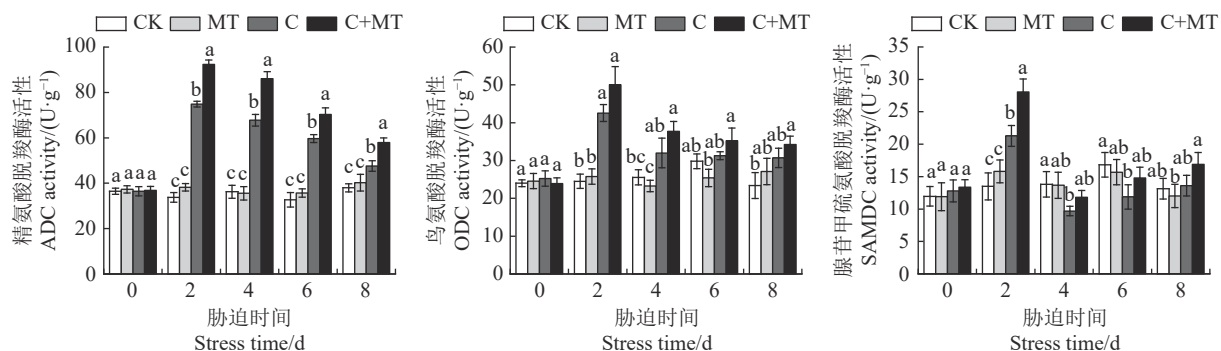


图3 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片多胺合成酶活性的影响

Fig. 3 Effect of melatonin on polyamine synthase activity in tomato leaves under low temperature stress

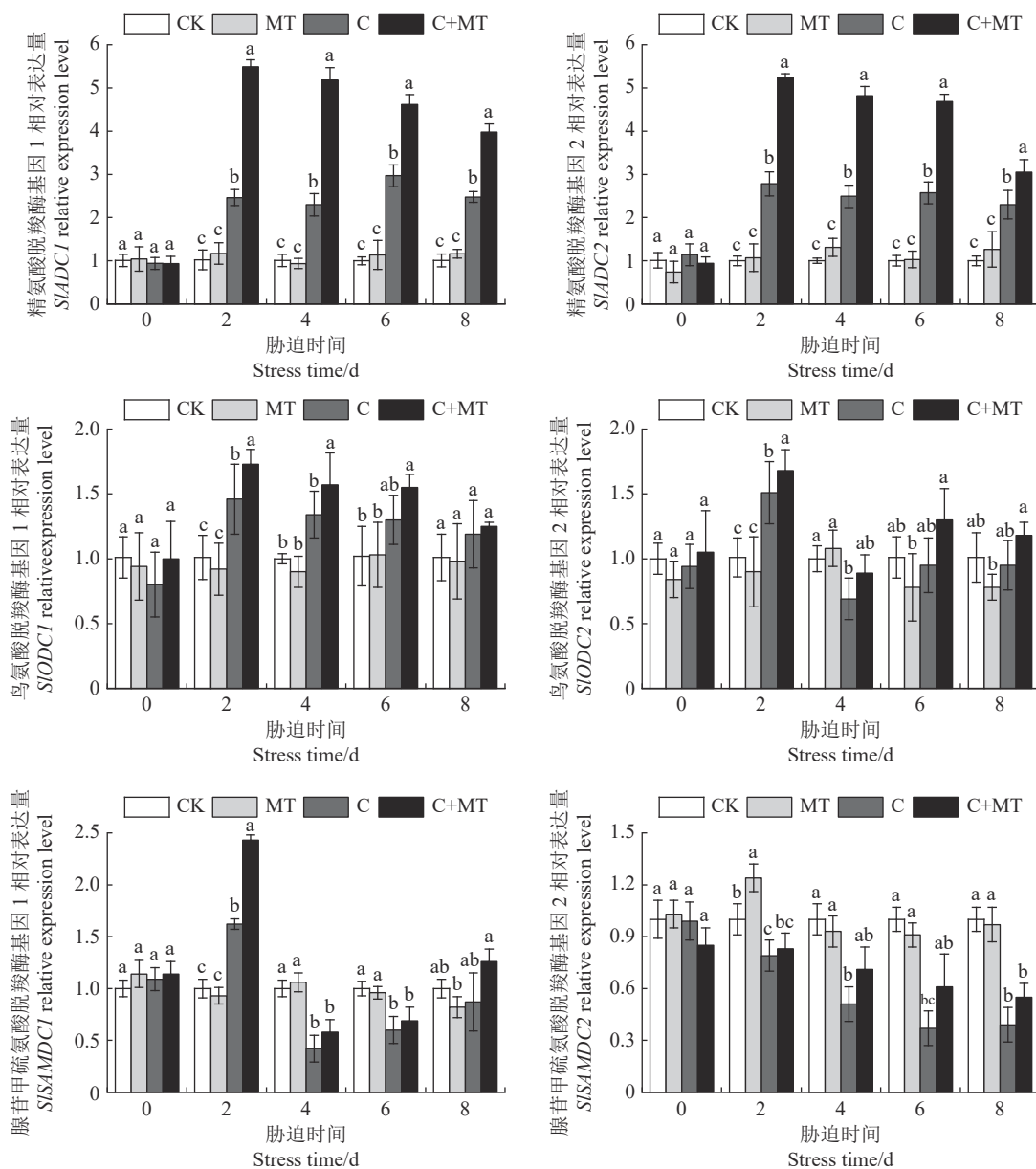


图4 褪黑素对低温胁迫下番茄幼苗叶片多胺合成酶基因表达的影响

Fig. 4 Effect of melatonin on polyamine synthase gene expression in tomato leaves under low temperature stress

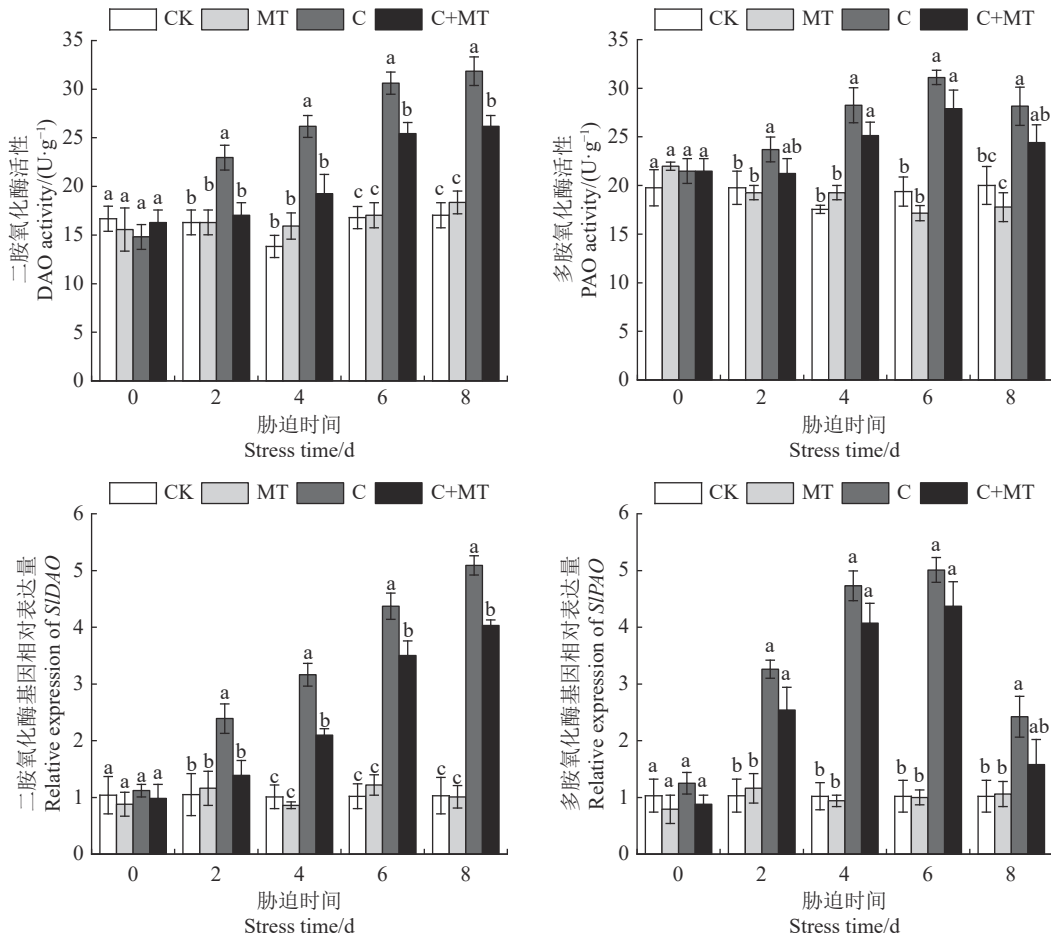


图 5 褪黑素对低温胁迫下番茄幼苗叶片多胺分解酶活性及其基因表达的影响

Fig. 5 Effects of melatonin on activity and gene expression of polyaminase in tomato leaves under low temperature stress

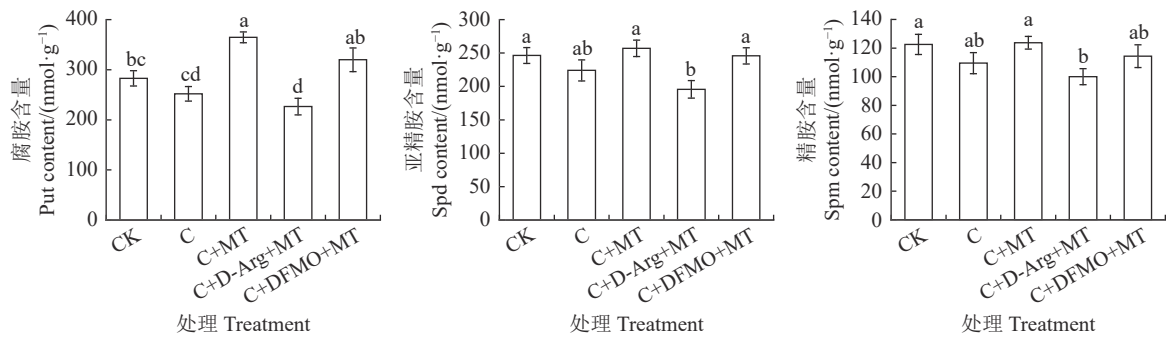


图 6 腐胺合成抑制剂对褪黑素诱导的番茄叶片多胺含量的影响

Fig. 6 Effect of Put synthesis inhibitor on polyamine content of tomato leaves induced by melatonin

时达到最大值, *SICBF1* 和 *SIMAPK3* 在 3 h 时达到最大值, *SICOR413* 和 *SIZAT12* 在 6 h 时达到最大值; 低温胁迫下褪黑素预处理在不同程度上进一步提高了番茄叶片中上述基因的表达量, 与低温处理相比 *SIICE1* 和 *SIMAPK3* 基因相对表达量在 1~6 h 显著上

调 ($P < 0.05$); *SICBF1* 在 12 h 内差异均达到显著水平, 比仅低温处理提高了 36.10%~82.14% ($P < 0.05$); *SICBF3* 除了 12h 时, 差异均显著 ($P < 0.05$); *SICOR413* 在 3~24 h 差异显著, 6 h 时增幅最大, 达到 49.23%; *SIZAT12* 的表达量在低温处理的所有时期均显著提

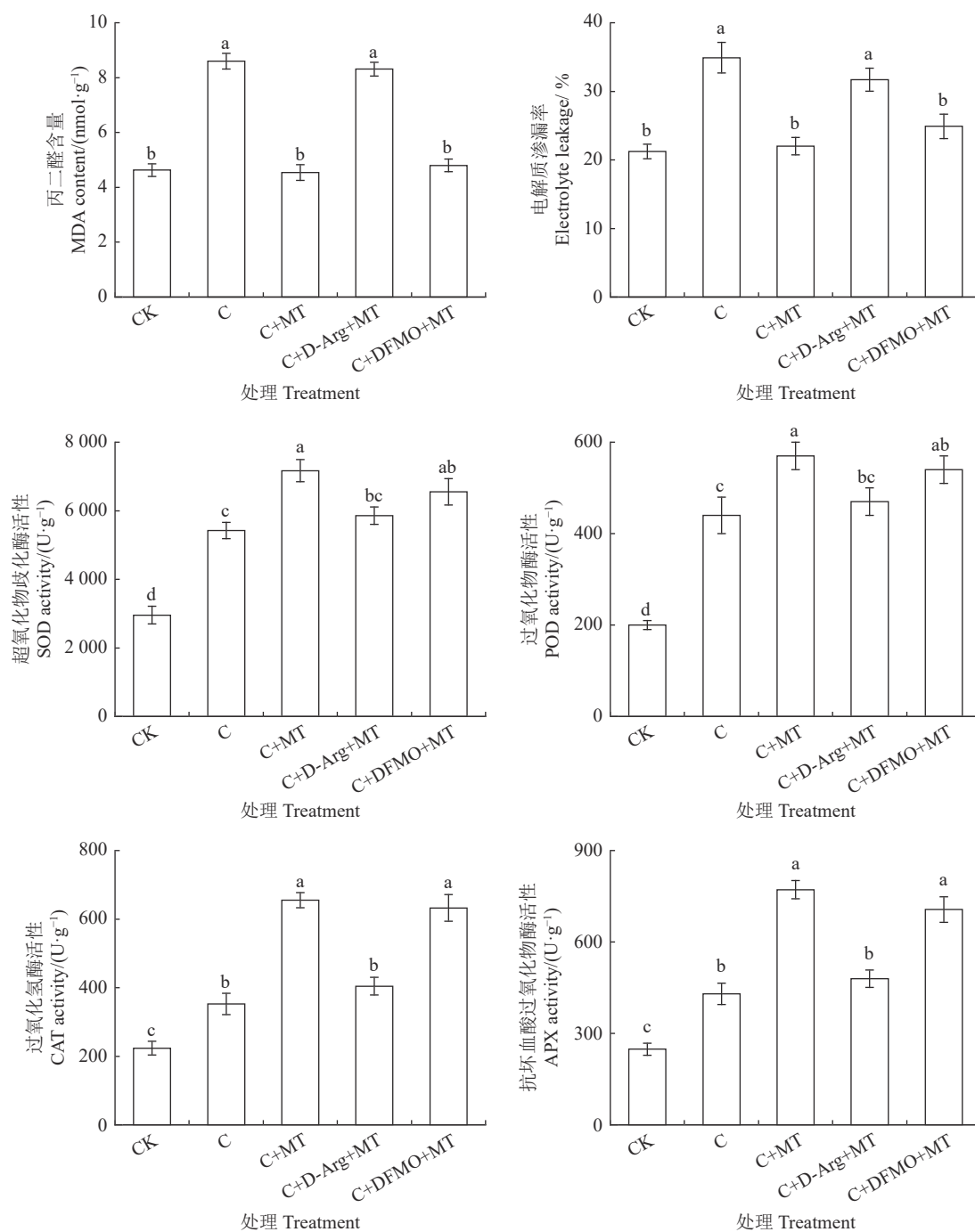


图7 腐胺合成抑制剂对褪黑素诱导的番茄叶片膜脂过氧化损伤和抗氧化酶活性的影响

Fig. 7 Effects of Put synthesis inhibitor on membrane lipid peroxidation damage and antioxidant enzyme activity of tomato leaves induced by melatonin

高, 3 h时增幅最大, 比低温处理提高了 172.63% ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 褪黑素影响低温胁迫下番茄幼苗膜脂过氧化

细胞膜系统是植物遭受冷害的主要部位^[24], 低温胁迫下植物 CO₂ 同化过程受到抑制, 植物对光能的吸收和利用失衡, 引起 ROS 过量积累, 导致膜脂过氧化, MDA 积累, 膜透性变大, 导致电解质外

渗, 引起植物细胞膜氧化损伤, 抑制植物生长^[25]。因此, MDA 和电解质渗漏率通常被认为是判断膜结构是否完整的指标, 用来衡量植物遭受胁迫伤害的程度^[26]。本研究中, 番茄在低温胁迫期间, 其叶片 MDA 含量和电解质渗漏率持续增加, 株高和鲜/干质量显著降低, 表明低温对番茄造成了氧化损伤, 且这一伤害随低温胁迫时间的延续而加剧, 这与刁倩楠等^[27]的研究结果一致。同时本研究还发现相较于单独低温处理, 100 μmol·L⁻¹ 褪黑素预处理后再进行

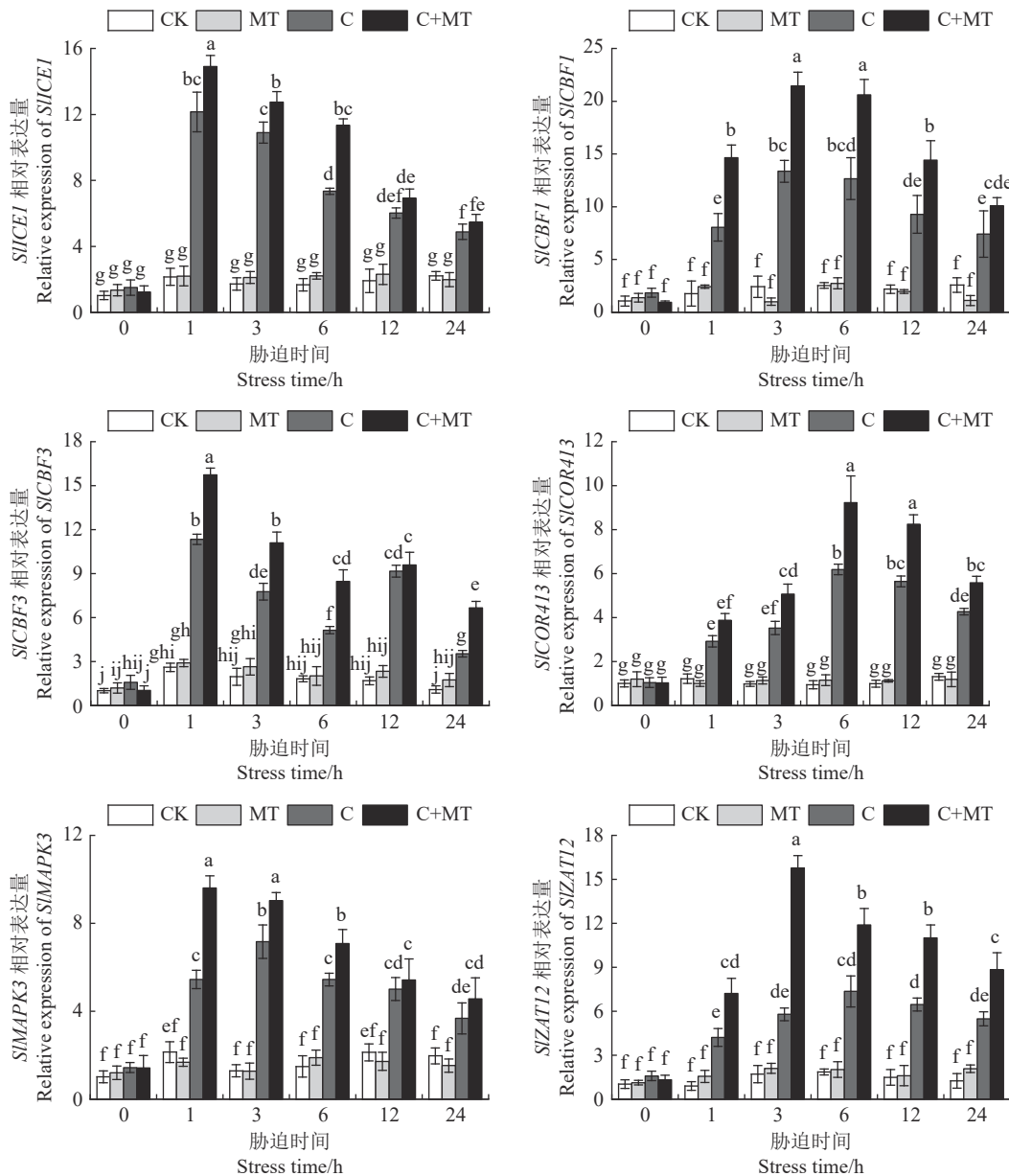


图 8 褪黑素对低温胁迫下番茄叶片低温响应基因表达的影响

Fig. 8 Effect of melatonin on low temperature response gene expression of tomato leaves under low temperature stress

低温处理能显著降低番茄叶片中 MDA 含量和电解质渗漏率, 增加番茄幼苗株高和干鲜质量, 这表明褪黑素能减轻低温胁迫对番茄植株造成的膜脂过氧化损伤, 保护细胞膜系统, 同时缓解低温胁迫对番茄幼苗生长的抑制作用, 这与盐胁迫下褪黑素对黄瓜幼苗的影响研究结果一致^[28]。但褪黑素具体是如何缓解低温胁迫导致的膜脂过氧化需做进一步研究探讨。

3.2 褪黑素影响低温胁迫下番茄的多胺代谢

当胁迫存在时, 外源褪黑素可以提高植物体内多胺的水平^[29]。例如高温胁迫下褪黑素可通过提高多胺合成酶基因的表达促进番茄叶片中多胺的合成, 强化抗氧化系统来增强番茄幼苗耐热性^[30]。

Zhang 等^[31]发现在涝害环境下外源施用褪黑素, 苜蓿叶片中多胺合成酶活性增加, 分解酶活性降低, 多胺含量大幅度增加。在低温胁迫下, 褪黑素通过提高 Put 和 Spd 水平, 稳定 Spm 水平, 减轻了黄瓜幼苗低温胁迫^[32], 这与我们的研究结果有所差异, 本研究中, 低温处理的各个时段, 褪黑素预处理后低温处理的番茄叶片中 Put 含量均显著高于单独低温处理, 但 Spd 和 Spm 的含量虽有所提高, 但除第 2 天外均未达到显著水平, 这可能是由于 Put、Spd 和 Spm 这 3 种多胺在不同的物种中及不同的胁迫下的响应存在差异。本研究结果表明, 在低温胁迫下褪黑素对番茄叶片中 Put 的积累有积极作用。有研究表明腐胺 (Put) 作为植物抵御冷害的一种保护性物

质,其含量越高,植物抗寒能力越强^[33], Song^[34]的研究也发现低温胁迫下番茄中植株中 Put 含量增加,植株耐寒性增强,这是因为腐胺带正电荷,能与细胞磷脂和核酸等结合,加强对细胞膜等组织的保护作用;其次腐胺作为一种可溶性物质,在胁迫环境下能够帮助平衡细胞的渗透压,保持细胞膜的稳定性,防止细胞内溶质外渗,以提高植物耐冷性;再者腐胺能调节活性氧代谢平衡减轻植物胁迫损伤^[35,36]。上述研究均表明低温胁迫下褪黑素很可能是通过番茄中腐胺含量,从而缓解低温胁迫导致的膜脂过氧化。

对褪黑素具体如何影响低温胁迫下腐胺在植株体内的积累,我们做了进一步的研究探讨,在植物体内 Put 的合成途径主要有精氨酸(Arg)途径和鸟氨酸(Orn)途径(对应2个合成前体 Arg 和 Orn),分别由精氨酸脱羧酶(ADC)和鸟氨酸脱羧酶(ODC)催化^[13]。本试验结果表明低温处理前用褪黑素预处理的番茄叶片中 Arg 含量、ADC 活性以及 ADC 合成相关基因的表达水平显著高于低温处理,而 Orn 含量、ODC 活性与 ODC 合成相关基因的表达水平无显著变化,这表明低温胁迫下褪黑素是通过诱导 ADC 催化精氨酸途径介导腐胺的合成缓解低温胁迫。为了验证这一结论,我们用精氨酸途径抑制剂 D-精氨酸(D-Arg)和鸟氨酸途径抑制剂二氟甲基鸟氨酸(DFMO)分别与褪黑素进行了联合预处理,结果发现低温胁迫下, D-Arg 显著降低了褪黑素诱导的番茄叶片中 Put 的含量,而 DFMO 对褪黑素诱导的 Put 的含量无影响,这进一步表明褪黑素诱导低温胁迫下番茄叶片中 Put 的合成主要是通过精氨酸途径,同时,相较于 MT 预处理, D-Arg 与 MT 联合预处理的番茄在低温胁迫下,其叶片 MDA 含量、电解质渗漏率显著提高,抗氧化酶活性显著降低,恢复至单独低温处理的水平,而 DFMO 与 MT 联合预处理后上述指标没有显著变化。这说明褪黑素可能是通过影响介导 Put 合成的精氨酸途径来减轻低温胁迫下番茄叶片细胞膜脂过氧化损伤程度以及增强抗氧化酶活性。

3.3 褪黑素影响低温胁迫下番茄幼苗耐冷基因的表达

植物已进化出多种策略应对包括冷胁迫在内的多种环境胁迫。前人研究发现植物的细胞膜首先上感知胁迫信号,随后转导至第二信使,并激活下游胁迫响应基因,最终诱导整个植物水平的保护性生理响应^[37]。目前在植物低温响应中,以 CBF 转录因子为核心的 ICE1-CBF-COR 信号感知-转导途径被研究得最为清楚。

研究发现植物在感知到低温信号后,其转录因子 CBFs 基因会被迅速诱导表达,随后 CBFs 蛋白通

过与下游冷响应基因 COR 的特定顺式元件进行结合来激活冷响应基因,从而增强植物的抗寒性^[38,39]。番茄有3个 CBFs 基因, SICBF1 基因表达与植株耐寒性呈正相关^[40],因此, SICBF1 表达水平通常被用来量化番茄植株的抗寒性。此外, ICE1 作为 CBF 的诱导因子,诱导 CBF1 表达,有研究就表明,低温胁迫下番茄 SICBF1 的高表达提高了 SICBF1 的表达量,增强了番茄的抗寒性^[25]。本研究发现,番茄叶片中 SICBF1、SICBF3 在低温处理中的相对表达量显著高于空白对照,同时在褪黑素与低温联合处理中的转录水平显著高于仅低温处理,这与 Shi 等^[8]在拟南芥上的研究结果一致。COR 蛋白是植物冷害调节通路 ICE1-CBF/DREB1-COR 的终末蛋白^[32]。有研究发现在番茄植株中 SICOR413 的过表达减轻了低温引起的叶绿体膜和结构的损伤,而抑制 SICOR413 的表达则加重了叶绿体损伤^[41]。低温胁迫会诱导 SICOR413 表达,有助于增强番茄对低温胁迫的抗性^[42],与本研究的结果一致。另外本研究中还发现褪黑素显著增加了低温胁迫下番茄叶片中 SICOR413 的相对表达量,这表明褪黑素可以保护低温胁迫下番茄的叶绿体膜,以维持叶绿体相对正常的功能和较高的光合能力来对抗冷害。综上,褪黑素能够通过提高低温胁迫下番茄叶片 ICE1-CBF-COR 通路基因(SICBF1、SICBF3、SICOR413)的转录水平,正向调节番茄对低温胁迫的响应。而 Kou 等^[43]的研究发现腐胺处理植株及 SaADC1 转基因株系中 CBFs 的表达明显被增强,在转基因株系中 CBF 下游的基因 CORs 的表达同样得到增强,说明 CBF-COR 途径可能会受 ADC1 介导的腐胺合成途径影响,促进低温相关代谢物质的积累,从而调节马铃薯的低温抗性,因此我们推测,褪黑素可能是通过提高番茄叶片中腐胺含量促进 CBFs 和 CORs 基因上调表达进而增强植株耐寒性。

在 ICE1-CBF-COR 信号通路中, ICE1 作为上游关键转录因子直接调控 CBFs 基因,与植物低温胁迫抗性密切相关^[44]。有研究表明植物的 CBFs 基因会在低温诱导的前期得到一定程度的积累,增强植物对低温的耐受性,但 CBFs 基因的过高表达对植物反而是一种伤害^[45,46],这时植物便会通过 MAPK3/6 磷酸化 ICE1 蛋白,抑制 CBFs 基因的过表达,使植物能够顺利抵御低温胁迫的同时还能良好生长^[47,48]。Ramirez 等^[49]研究也表明 MPK3/6-ICE1-CBF 调控途径创造了低温胁迫和生长之间的平衡,从而提高植物暴露到低温胁迫下的存活率。Wang 等^[50]研究表明低温胁迫能激活 SIMAPK3 增强番茄的耐冷性,这与本研究结

果一致。在本研究中我们还发现, 低温胁迫下褪黑素处理显著提高了 *SIMAPK3* 基因表达量, 有研究表明 Spm 能够活化 MAPK, 诱导 MAPK 相关基因的表达^[51]。而 Spm 的合成离不开腐胺, 同时我们的研究已发现褪黑素可以促进低温胁迫下番茄叶片中腐胺的合成, 因此我们猜测褪黑素可能是通过诱导腐胺的合成影响 *SIMAPK3* 基因, 促使 ICE1 蛋白磷酸化减轻因低温胁迫诱导的 *CBFs* 基因的过表达而对生长发育造成的抑制作用, 使得植株在抵御低温胁迫得同时还能正常生长发育。

ZAT12 是锌指蛋白转录因子, 在激活活性氧信号通路以及抗氧化系统方面发挥关键作用^[52]。Bajwa 等^[9]发现, C2H2 型锌指蛋白和 *CBFs* 均参与拟南芥中褪黑素介导的低温应激反应。本试验研究结果表明低温胁迫下褪黑素预处理显著提高了低温胁迫下 *SIZAT12* 基因的表达量, 这与 Li 等^[53] 在平邑甜茶上的研究结果一致。并且褪黑素预处理提高了低温胁迫下番茄叶片抗氧化酶的活性, 因此褪黑素可能通过激活番茄植株中 ROS 信号通路关键转录因子基因 *SIZAT12* 的表达, 增强抗氧化系统, 缓解番茄植株氧化损伤。除此之外, Zhao 等^[54] 研究发现在低温条件下 ZAT12 通过上调 *ADC1* 和 *ADC2* 表达触发精氨酸途径, 进而促进 Put 合成, 这表明褪黑素可能通过提高 *SIZAT12* 的表达水平促进腐胺的合成, 从而增强番茄植株的抗寒性。

4 结论

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的褪黑素可通过正向调节精氨酸途径促进 Put 合成, 以及抑制 Put 分解来增加 Put 的积累量, 这减轻了番茄的膜脂过氧化损伤, 提高了番茄抗氧化能力, 缓解低温胁迫对番茄幼苗生长的抑制作用。除此之外, 褪黑素促进了番茄叶片中与腐胺密切相关的低温响应基因表达, 增强了番茄幼苗低温胁迫耐受性。褪黑素可能通过影响腐胺的合成, 调控耐冷基因表达, 从而提高番茄植株低温胁迫耐受性, 更深入的机理有待进一步验证。

参考文献:

- [1] LIU H, OUYANG B, ZHANG J H, et al. Differential modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (11): e50785.
- [2] LIU Y F, QI M F, LI T L. Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery [J]. *Plant Science*, 2012, 196: 8–17.
- [3] SHI H T, JIANG C, YE T T, et al. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous melatonin [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 66 (3): 681–694.
- [4] GONG X Q, SHI S T, DOU F F, et al. Exogenous melatonin alleviates alkaline stress in *Malus hupehensis* rehd. by regulating the biosynthesis of polyamines [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22 (9): 1542.
- [5] 张贵友, 李萍, 戴尧仁. 低温胁迫下褪黑素对烟草悬浮细胞精氨酸脱羧酶活性的影响 [J]. *植物学通报*, 2005, 40 (5): 555–559.
- ZHANG G Y, LI P, DAI Y R. Arginine decarboxylase activity is increased in tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension cells by exogenous melatonin during cold stress [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 40 (5): 555–559. (in Chinese)
- [6] KE Q B, YE J, WANG B M, et al. Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 914.
- [7] BOSE S K, HOWLADER P. Melatonin plays multifunctional role in horticultural crops against environmental stresses: A review [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2020, 176: 104063.
- [8] SHI H T, CHAN Z L. The cysteine2/histidine2-type transcription factor zinc finger of *Arabidopsis thaliana* 6-activated c-repeat-binding factor pathway is essential for melatonin-mediated freezing stress resistance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Pineal Research*, 2014, 57 (2): 185–191.
- [9] BAJWA V S, SHUKLA M R, SHERIF S M, et al. Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Pineal Research*, 2014, 56 (3): 238–245.
- [10] LI H, CHANG J J, ZHENG J X, et al. Local melatonin application induces cold tolerance in distant organs of *Citrullus lanatus* L. via long distance transport [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40858.
- [11] LEI X Y, ZHU R Y, ZHANG G Y, et al. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: The possible involvement of polyamines [J]. *Journal of Pineal Research*, 2004, 36 (2): 126–131.
- [12] LI H, HE J, YANG X Z, et al. Glutathione-dependent induction of local and systemic defense against oxidative stress by exogenous melatonin in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Pineal Research*, 2016, 60 (2): 206–216.
- [13] FUELL C, ELLIOTT K A, HANFREY C C, et al. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48 (7): 513–520.
- [14] 王学奎, 黄见良. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2015: 280–281.
- [15] ISHITANI M, XIONG L, LEE H, et al. HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10 (7): 1151–1161.
- [16] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases [J]. *Plant Physiology*, 1977, 59 (2): 309–314.
- [17] NICKEL K S, CUNNINGHAM B A. Improved peroxidase assay

- method using leuco 2, 3', 6-trichloroindophenol and application to comparative measurements of peroxidatic catalysis [J]. *Analytical Biochemistry*, 1969, 27 (2) : 292–299.
- [18] DHINDSA R S, PLUMB-DHINDSA P L, REID D M. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen [J]. *Physiologia Plantarum*, 1982, 56 (4) : 453–457.
- [19] PINHERO R G, RAO M V, et al. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings [J]. *Plant Physiology*, 1997, 114 (2) : 695–704.
- [20] DUAN J J, LI J, GUO S R, et al. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165 (15) : 1620–1635.
- [21] ZHAO F G, SUN C, LIU Y L, et al. Relationship between polyamine metabolism in roots and salt tolerance of barley seedlings [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45 (3) : 295–300.
- [22] SU G X, AN Z F, ZHANG W H, et al. Light promotes the synthesis of lignin through the production of H₂O₂ mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162 (12) : 1297–1303.
- [23] COHEN S A, BIDLINGMEYER B A, TARVIN T L. PITC derivatives in amino acid analysis [J]. *Nature*, 1986, 320 (6064) : 769–770.
- [24] STEPONKUS P L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35: 543–584.
- [25] MIURA K, SHIBA H, OHTA M, et al. SlICE1 encoding a MYC-type transcription factor controls cold tolerance in tomato, *Solanum lycopersicum* [J]. *Plant Biotechnology*, 2012, 29 (3) : 253–260.
- [26] DIONISIO-SESE M L, TOBITA S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress [J]. *Plant Science*, 1998, 135 (1) : 1–9.
- [27] 刁倩楠, 范红伟, 张文献, 等. 外源物质对低温下甜瓜种子萌发和幼苗生理特性的影响 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18 (21) : 7209–7216.
- DIAO Q N, FAN H W, ZHANG W X, et al. Exogenous substances on seed germination, physiological characteristics of melon under chilling stress [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (21) : 7209–7216. (in Chinese)
- [28] WANG L Y, LIU J L, WANG W X, et al. Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress [J]. *Photosynthetica*, 2016, 54 (1) : 19–27.
- [29] 巩彪, 史庆华. 园艺作物褪黑素的研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2017, 50 (12) : 2326–2337.
- GONG B, SHI Q H. Review of melatonin in horticultural crops [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50 (12) : 2326–2337. (in Chinese)
- [30] JAHAN M S, SHU S, WANG Y, et al. Melatonin alleviates heat-induced damage of tomato seedlings by balancing redox homeostasis and modulating polyamine and nitric oxide biosynthesis [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19 (1) : 414.
- [31] ZHANG Q, LIU X F, ZHANG Z F, et al. Melatonin improved waterlogging tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by reprogramming polyamine and ethylene metabolism [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 44.
- [32] BRETON G, DANYLUK J, CHARRON J B F, et al. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132 (1) : 64–74.
- [33] 范华, 冯双庆, 赵玉梅. 黄瓜、番茄冷害以及黄瓜温度预处理与多胺的相关性 [J]. *中国农业大学学报*, 1996, 1 (1) : 108–112.
- FAN H, FENG S Q, ZHAO Y M. The correlation of polyamines with chilling injury of cucumber and tomato and the treatments for alleviating chilling injury [J]. *Journal of China Agricultural University*, 1996, 1 (1) : 108–112. (in Chinese)
- [34] SONG Y J, DIAO Q N, QI H Y. Putrescine enhances chilling tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through modulating antioxidant systems [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36 (11) : 3013–3027.
- [35] LIU J H, KITASHIBA H, WANG J, et al. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants [J]. *Plant Biotechnology*, 2007, 24 (1) : 117–126.
- [36] WANG J, SUN P P, CHEN C L, et al. An arginine decarboxylase gene PtADC from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (8) : 2899–2914.
- [37] 计淑霞, 戴绍军, 刘炜. 植物应答低温胁迫机制的研究进展 [J]. *生命科学*, 2010, 22 (10) : 1013–1019.
- JI S X, DAI S J, LIU W. The advances of plants in response and adaption to low temperature stress [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22 (10) : 1013–1019. (in Chinese)
- [38] THOMASHOW M F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance [J]. *Plant Physiology*, 1998, 118 (1) : 1–8.
- [39] SHI Y T, DING Y L, YANG S H. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation [J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23 (7) : 623–637.
- [40] WANG D Z, JIN Y N, DING X H, et al. Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants [J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2017, 82 (10) : 1103–1117.
- [41] MA X C, CHEN C, YANG M M, et al. Cold-regulated protein (SICOR413IM1) confers chilling stress tolerance in tomato plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 124: 29–39.
- [42] WANG F, CHEN X X, DONG S J, et al. Crosstalk of PIF4 and DELLA modulates CBF transcript and hormone homeostasis in cold response in tomato [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (4) : 1041–1055.
- [43] KOU S, CHEN L, TU W, et al. The arginine decarboxylase gene ADC1, associated to the putrescine pathway, plays an important role in potato cold-acclimated freezing tolerance as revealed by transcriptome and metabolome analyses [J]. *The Plant Journal*, 2018, 96 (6) : 1283–1298.

- [44] KIM Y S, LEE M, LEE J H, et al. The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89 (1/2) : 187–201.
- [45] PARK S, LEE C M, DOHERTY C J, et al. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network [J]. *The Plant Journal*, 2015, 82 (2) : 193–207.
- [46] GILMOUR S J, FOWLER S G, THOMASHOW M F. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF₃ have matching functional activities [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54 (5) : 767–781.
- [47] LI H, DING Y L, SHI Y T, et al. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2017, 43 (5) : 630–642.e4.
- [48] LIU Y K, ZHOU J. MAPPING kinase regulation of ICE1 in freezing tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23 (2) : 91–93.
- [49] RAMIREZ V E, POPPENBERGER B. MAP kinase signaling turns to ICE [J]. *Developmental Cell*, 2017, 43 (5) : 545–546.
- [50] WANG L, ZHAO R R, ZHENG Y Y, et al. SIMPK_{1/2/3} and antioxidant enzymes are associated with H₂O₂-induced chilling tolerance in tomato plants [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65 (32) : 6812–6820.
- [51] TAKAHASHI Y, BERBERICH T, MIYAZAKI A, et al. Spermine signalling in tobacco: Activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction [J]. *The Plant Journal*, 2003, 36 (6) : 820–829.
- [52] DAVLETOVA S, SCHLAUCH K, COUTU J, et al. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139 (2) : 847–856.
- [53] LI C, WANG P, WEI Z W, et al. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis* [J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 53 (3) : 298–306.
- [54] ZHAO Y, TAN D X, LEI Q, et al. Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 55 (1) : 79–88.

(责任编辑: 于洪杰)