

周琳,杨柳燕,潘琦,等. 外源一氧化氮处理对山茶抗寒性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):142-147.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.032

外源一氧化氮处理对山茶抗寒性的影响

周琳¹,杨柳燕¹,潘琦¹,张斌²,房婉萍³,朱旭君³,张永春¹

(1. 上海市农业科学院林木果树研究所,上海 201106; 2. 上海星源农业实验场,上海 201403; 3. 南京农业大学,江苏南京 210095)

摘要:以花鹤翎、六角大红茶花为材料,以硝普钠(SNP)为外源一氧化氮(NO)供体,研究外源 NO 对低温胁迫条件下山茶花生理特性的影响。结果表明,在正常生长条件下,外源 NO 对 2 个山茶花品种的叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白、游离脯氨酸(Pro)含量以及 O_2^- 生成速率影响不显著,但对超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的活性略有提高。低温胁迫下,2 个山茶花品种的叶绿素含量降低,可溶性糖、可溶性蛋白、Pro、过氧化氢(H_2O_2)、丙二醛(MDA)含量以及 O_2^- 生成速率显著增加,SOD、CAT、POD 活性显著提高。低温胁迫下,外源 NO 处理显著减少了 H_2O_2 和膜脂过氧化物产物 MDA 的积累,显著提高了叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白含量以及 SOD、CAT、POD 活性。低温胁迫下,外源 NO 可通过提高山茶可溶性物质含量以及抗氧化酶活性,降低 H_2O_2 和 MDA 的积累,从而保护细胞膜结构的稳定性,最终减轻冷胁迫对山茶花的伤害,增强其抗冷性。

关键词:山茶;一氧化氮;生理生化;抗寒性

中图分类号: S685.140.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0142-06

山茶花(*Camellia japonica* L.)属山茶科山茶属,主要分布于我国西南和南部温暖地区。山茶具有叶色浓绿、常年不凋,花色花型多样丰富等优点,是我国的十大传统名花之一,也是世界驰名花卉。目前茶花栽培品种已达万余个,在英、美、日、意、法等国家都有栽培和培育,成为各国不可或缺的庭院观赏花木,具有较高的经济价值。山茶花喜温暖湿润气候,适宜温度在 20~25℃之间,在炎热和寒冷地区其长势较差,当温度高于 35℃则会引起叶片灼伤、花芽分化受阻、落蕾落花,严重时甚至导致干枯死亡^[1]。虽然山茶大部分品种可耐-8℃低温,淮河以南地区多数可自然越冬,但大多数山茶在北方地区不能安全越冬。因此,耐热性和耐寒性是其应用推广的重要基础研究。目前,山茶耐热性研究已引起了研究者的重视^[2-3],而耐寒性研究目前主要集中于山茶属经济作物茶树上^[4],因此研究低温胁迫下山茶的生理生化,提高山茶抗寒性具有重要意义,且对于丰富北方冬季园林景观具有十分重要的价值。

一氧化氮(nitric oxide)作为易透膜且化学性质活跃的生物小分子,除了参与种子萌发、叶片伸展、根系生长、花芽分化、枝条抽生、花粉管生长、气孔关闭以及细胞程序性死亡,还广泛参与非生物胁迫下的信号传导,在低温胁迫、干旱胁迫、高温胁迫、盐胁迫、重金属胁迫等非生物胁迫中作为信号分子

起着重要作用^[5]。外源 NO 在植物非生物胁迫中的作用已受到植物界的普遍关注,已有研究表明,施用外源 NO 可提高拟南芥、番茄、小麦、玉米、南瓜等植物的抗寒性^[6-9]。随着研究的深入,发现外源 NO 可通过上调抗氧化酶基因、 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因(*P5CS1*)和脯氨酸脱氢酶基因(*ProDH*)等渗透调节物质相关基因的表达,从而提高抗氧化酶活性以及渗透调节物质含量,减轻低温胁迫对植物的伤害,并且提高植物抗寒性^[8,10-11]。

山茶花品种花鹤翎花型漂亮、树型美观、病虫害少且管理养护较为简单,喜温暖环境,其花期可从 2 月持续至 5 月,具有园林绿化应用前景;山茶花品种六角大红为大红色,基本为完全重瓣型,花期可从 12 月中下旬持续至 4 月初,花朵初放至凋谢期间,花瓣始终保持挺拔,无后翻和明显褪色现象,即使低温环境下,花瓣边缘仍保持不焦枯。因此,本试验针对山茶在我国北方冬季难以安全越冬问题,以花色艳丽、树形美观、具有园林绿化开发应用前景的茶花品种花鹤翎和六角大红为试验材料,研究外源施加 NO 对低温胁迫下山茶生理特性的影响,探讨外源 NO 对提高山茶抗冷性的作用,以期对北方地区山茶花有效防御冬季低温冷害提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

选用浙江省金华市扦插繁殖 2 年生花鹤翎和六角大红茶花,各 150 株。试验于 2017 年 4 月在上海农业科学院玻璃温室和人工气候箱中进行,昼夜温度为 25℃/20℃,光周期为 12 h/12 h,相对湿度为 75%~80%,所有山茶花在玻璃温室中培养 1 个月用于后期研究。

试验使用的 NO 供体为硝普钠[$Na_2Fe(CN)_5$],购自于 Sigma 公司,纯度为 98.5%,并用蒸馏水配制成 5 mmol/L 的

收稿日期:2018-07-06

基金项目:中国博士后科学基金(编号:2019M651550);上海市农委产业体系建设专项[编号:沪农科产字(2018)第 8 号];上海市科技兴农项目(2015);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)2018];国家茶叶产业技术体系项目(编号:CARS-19)。

作者简介:周琳(1989—),女,江苏无锡人,博士,主要从事花卉遗传育种研究。E-mail:zhoulin6816@126.com。

通信作者:张永春,研究员,主要从事花卉栽培和种质创新研究。E-mail:saasflower@163.com。

母液,4 ℃ 保存,试验时按所需浓度进行稀释。

1.2 试验设计

培养 1 个月后将 2 个品种的山茶花进行试验处理。外源喷施 SNP 溶液和纯水,均为对山茶苗叶片均匀喷雾,直至有水滴落下为止。试验分为以下处理:(1)T1:喷施 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP 溶液,常温处理;(2)T2:喷施纯水后,0 ℃ 人工气候箱低温处理;(3)T3:喷施处理 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP 溶液,0 ℃ 人工气候箱低温处理。分别处理 0、4、8、12、24、48 h 时取山茶叶片,擦去叶片表面灰尘,称质量后放入液氮速冻,-80 ℃ 冰箱保存。

1.3 测定指标及测定方法

叶绿素含量测定参照李合生的方法^[12];采用萘酚比色法测定可溶性糖含量^[13];采用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白含量^[14];采用酸性茚三酮显色法测定游离脯氨酸(Pro)含量^[15];超氧阴离子自由基(O_2^-)产生速率测定参照王爱国等的方法^[16];采用刘俊等方法测定 H_2O_2 含量^[17];采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量^[18];采用 NBT(氮蓝四唑)法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性^[19];采用紫外吸收法测定过氧化氢酶(CAT)活性^[20];采用愈创木酚法测定过氧化物酶(POD)活性^[21]。以上所有指标均重复测定 3 次。

表 1 低温胁迫下喷施外源 SNP 后山茶叶片叶绿素含量动态变化($\bar{x} \pm s$)

品种名	处理	不同处理时间的叶绿素含量(mg/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	3.46 \pm 0.04Aa	3.43 \pm 0.07Aa	3.40 \pm 0.08Aa	3.39 \pm 0.08Aa	3.46 \pm 0.04Aa
	T2	3.39 \pm 0.04Aa	3.06 \pm 0.03Db	2.22 \pm 0.08Ec	2.32 \pm 0.05Cc	2.29 \pm 0.11Cc
	T3	3.40 \pm 0.18Aa	3.09 \pm 0.01CDb	3.00 \pm 0.01Cb	2.37 \pm 0.02Cc	2.43 \pm 0.14CDc
六角大红	T1	3.39 \pm 0.02Aab	3.48 \pm 0.10Aa	3.25 \pm 0.13Bb	3.34 \pm 0.14Aab	3.41 \pm 0.08Aab
	T2	3.33 \pm 0.08Aa	3.22 \pm 0.15BCa	2.50 \pm 0.03Dc	2.72 \pm 0.02Bb	2.64 \pm 0.07BCbc
	T3	3.33 \pm 0.02Aa	3.25 \pm 0.09Ba	3.14 \pm 0.05Ba	2.79 \pm 0.19Bb	2.72 \pm 0.29Bb

注:同列不同大写字母表示相同时间不同处理之间差异显著($P < 0.05$),同行不同小写字母表示相同处理不同时间之间差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.2 外源 NO 对低温胁迫下山茶叶片可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量的影响

可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸是植物细胞器渗透调节作用的重要物质。从表 2 可见,正常生长下喷施 SNP(T1)对 2 个山茶花叶片的可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量无明显影响。低温胁迫下,2 个山茶品种在 4 h 时可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量已显著提高($P < 0.05$),且随着胁迫时间的延长而显著增加。低温胁迫下,喷施 SNP 处理(T3)2 个山茶品种的可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量在 4~48 h 期间显著增加,且其含量始终高于同时期的低温处理(T2)。低温胁迫下(T2、T3 处理),六角大红的可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量始终高于花鹤翎。表明外源 NO 能提高山茶叶片中可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量,从而提细胞液浓度,降低质膜受冻害的程度,从而缓解低温对山茶造成的伤害。

2.3 外源 NO 对低温胁迫下山茶叶片 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 、MDA 含量的影响

超氧阴离子自由基(O_2^-)是分子氧单电子还原产生的阴离子自由基,在植物体内其不断地产生也不断被清除,而在

1.4 数据统计分析

试验数据用软件 Excel 2010 进行统计和 SPSS 20.0 进行分析,采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对低温胁迫下山茶叶片叶绿素含量的影响

叶绿素是绿色植物进行光合作用的主要色素,对光能的吸收、传递和转化起着极其重要的作用,因此叶绿素的含量与组成同植物光合作用有着密切的关系。外源 NO 处理下,山茶叶片叶绿素含量变化见表 1。常温下,外源 SNP 处理(T1 处理)花鹤翎叶绿素含量不同处理时间之间不显著,六角大红在处理后的 4 h 时含量提高至 3.48 mg/g,在 12 h 时下降至 3.25 mg/g,24、48 h 时升高至 3.34、3.41 mg/g。在低温胁迫下(T2 处理),花鹤翎和六角大红在 4~48 h 期间其叶绿素含量均显著下降。花鹤翎和六角大红在喷施 SNP 后,低温胁迫处理下(T3 处理),虽然叶绿素含量在 4~48 h 期间均显著降低,但其含量均高于同时期的 T2 处理。此外,在 T2、T3 处理下,六角大红叶叶绿素含量均高于同时期的花鹤翎。说明施加外源 NO 能够增加低温胁迫下山茶叶片的叶绿素含量,提高光合作用和生长。

逆境胁迫下,则导致其迅速积累^[22]。常温下, O_2^- 在外源 NO 处理下,其生成速率在 0.37~0.40 nmol/(g·min)间浮动且差异不显著。低温胁迫下(T2),花鹤翎和六角大红的生成速率则在 4 h 时已分别显著提高至 0.55、0.64 nmol/(g·min);花鹤翎随着低温胁迫时间的延长,在 48 h 时已达 0.93 nmol/(g·min),而六角大红则在 4~24 h 期间保持在 0.65 nmol/(g·min)以下,在 48 h 时仅为 0.70 nmol/(g·min)。T3 处理下,花鹤翎和六角大红的 O_2^- 生成速率虽然随着低温胁迫时间的延长而显著增加,但在 4、12、24、48 h 时均显著低于同时期的 T2 处理(表 3)。表明外源 NO 处理可减少山茶花叶片中 O_2^- 积累。

低温胁迫会引发 H_2O_2 的大量产生,过量的 H_2O_2 得不到及时清除,则会对植物造成毒害作用。丙二醛含量的变化反映着环境胁迫下细胞内氧自由基积累导致的脂膜过氧化程度,其含量越高表明植物受逆境胁迫伤害程度越大。正常生长条件下,花鹤翎和六角大红在外源 NO 处理下, H_2O_2 和丙二醛含量虽然分别在 0.17~0.23 $\mu\text{mol/g}$ 、1.04~1.27 nmol/g 之间浮动变化,但其含量始终都显著处于较低水平,且显著低于低温胁迫时的含量。低温胁迫下,2 个山茶品种 H_2O_2 、丙二

表 2 低温胁迫下喷施外源 SNP 后山茶叶片可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量动态变化($\bar{x} \pm s$)

品种名	处理	不同处理时间的可溶性糖含量(%)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	10.83 ± 0.27Aa	11.3 ± 0.37Ba	11.33 ± 0.41Da	10.91 ± 0.62Da	11.79 ± 0.08Ea
	T2	10.79 ± 0.50Ae	12.16 ± 0.48Bd	15.83 ± 0.62Cc	23.19 ± 0.56Cb	28.08 ± 0.91Da
	T3	10.85 ± 0.34Ad	23.58 ± 1.92Ac	26.57 ± 1.28Bb	28.64 ± 0.65Ba	29.16 ± 0.31Ca
六角大红	T1	10.50 ± 0.47Aa	10.81 ± 0.71Ba	10.79 ± 0.70Da	11.13 ± 0.17Da	11.08 ± 0.19Ea
	T2	9.92 ± 1.02Ae	24.52 ± 1.03Ad	27.07 ± 0.89ABc	29.19 ± 0.76Bb	31.75 ± 0.33Ba
	T3	10.33 ± 0.83Ae	24.98 ± 0.73Ad	28.49 ± 0.80Ac	31.75 ± 0.33Ab	35.39 ± 0.52Aa

品种名	处理	不同处理时间的可溶性蛋白质含量(μg/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	13.75 ± 0.61Aa	13.89 ± 0.17Da	14.53 ± 0.30Da	14.68 ± 1.16Da	14.89 ± 0.30Ea
	T2	12.65 ± 0.50Bc	28.04 ± 0.48Cab	30.24 ± 2.67Ca	26.80 ± 2.16Cb	30.24 ± 1.34Da
	T3	12.85 ± 0.34Bc	33.14 ± 1.92Bb	35.17 ± 0.45Bb	39.42 ± 2.44Ba	41.27 ± 0.32Ca
六角大红	T1	12.53 ± 0.68Bb	12.50 ± 1.13Eb	15.13 ± 0.50Da	14.13 ± 0.17Da	14.08 ± 0.19Ea
	T2	14.20 ± 0.73Ae	34.52 ± 1.03Bd	37.07 ± 0.89Bc	41.19 ± 1.17Bb	48.76 ± 1.07Ba
	T3	14.60 ± 0.57Ad	37.13 ± 0.73Ac	43.72 ± 0.96Ab	53.14 ± 0.32Aa	56.78 ± 0.52Aa

品种名	处理	不同处理时间的游离脯氨酸含量(μg/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	10.96 ± 0.62ABa	11.56 ± 0.15Ea	10.80 ± 0.30Da	11.72 ± 1.17Da	11.94 ± 0.27Da
	T2	11.10 ± 0.50ABe	16.81 ± 0.48Dd	20.68 ± 0.68Cc	25.87 ± 0.69Cb	28.68 ± 0.89Ca
	T3	10.73 ± 0.34ABe	20.04 ± 1.21Cd	25.17 ± 0.45Bc	29.42 ± 2.44Bb	32.24 ± 0.32Ba
六角大红	T1	10.52 ± 0.67Ba	10.49 ± 1.13Ea	10.58 ± 0.50Da	9.58 ± 0.17Da	9.53 ± 0.19Ea
	T2	11.68 ± 0.73ABd	22.37 ± 1.03Bc	24.93 ± 0.90Bb	25.44 ± 1.20Cb	33.00 ± 1.09Ba
	T3	10.83 ± 0.59Ae	25.80 ± 0.73Ad	29.06 ± 0.55Ac	33.15 ± 0.33Ab	36.81 ± 0.53Aa

表 3 低温胁迫下喷施外源 SNP 后山茶叶片 O₂⁻· 生成速率动态变化($\bar{x} \pm s$)

品种名	处理	不同处理时间的 O ₂ ⁻ · 生成速率[nmol/(g·min)]				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	0.38 ± 0.00Aa	0.39 ± 0.02Da	0.39 ± 0.01Ca	0.37 ± 0.01Fa	0.39 ± 0.01Ea
	T2	0.39 ± 0.01Ad	0.55 ± 0.01Cc	0.52 ± 0.02Bc	0.71 ± 0.03Ab	0.93 ± 0.04Aa
	T3	0.39 ± 0.02Ac	0.59 ± 0.03Bb	0.64 ± 0.06Aab	0.67 ± 0.01Ba	0.65 ± 0.03Cab
六角大红	T1	0.39 ± 0.01Aa	0.38 ± 0.01Da	0.39 ± 0.01Ca	0.40 ± 0.01Ea	0.39 ± 0.01Ea
	T2	0.38 ± 0.01Ad	0.64 ± 0.00Ab	0.64 ± 0.00Ab	0.61 ± 0.01Cc	0.70 ± 0.01Ba
	T3	0.39 ± 0.01Ac	0.54 ± 0.01Cb	0.54 ± 0.01Bb	0.53 ± 0.01Db	0.61 ± 0.01Da

醛含量随着胁迫时间的延长而显著增加,在 48 h 时,花鹤翎和六角大红的 H₂O₂ 含量分别达到了 0.82、0.70 μmol/g;丙二醛含量分别达到 6.11、5.50 nmol/g。外源 NO 处理(T3)的 2 个山茶品种虽然变化趋势和 T2 处理一致,但在处理期间 H₂O₂ 和丙二醛含量均低于同时期的 T2 处理(表 4)。表明常温下外源 NO 虽然会引起山茶 H₂O₂ 和丙二醛含量的变化,但并未对其造成伤害;而低温胁迫下,外源 NO 处理能有效减少 H₂O₂ 的大量产生,降低膜脂过氧化程度。

2.4 外源 NO 对低温胁迫下山茶叶片抗氧化酶活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)是植物保护酶系统中的重要 3 种酶,在清除生物自由基上担负着重要功能。SOD 能将 O₂⁻· 转化为 H₂O₂,而 CAT 和 POD 可将 H₂O₂ 进一步清除产生 H₂O,三者协同作用可使自由基维持在一个较低水平,从而避免膜伤害,达到保护细胞的目的。由表 5 可知,正常生长条件下喷施 SNP(T1)提高了山茶的 SOD、CAT、POD 活性,即使处理达 48 h 时,花鹤翎的酶活性分别为 109.17、99.08、925.33 U/g,六角大红的酶活性

分别为 114.18、160.12、952.00 U/g,均显著高于 0 h 时的酶活性。2 个品种的山茶在低温胁迫下(T2),SOD、CAT、POD 活性都显著,在 48 h 时花鹤翎酶活性比 0 h 相比提高了 73.54%、59.12%、52.45%,六角大红则分别提高了 168.77%、192.34%、53.03%。外源 NO 处理下(T3),SOD、CAT、POD 活性随着低温胁迫时间的延长而显著增强,且其活性始终高于同时期的 T2 处理。说明随着低温胁迫时间的延长,山茶细胞内 O₂⁻· 和 H₂O₂ 含量已超出正常水平(表 3、表 4),触发了细胞内抗氧化酶活性增强,其活性显著上升表明低温胁迫下其清除自由基的能力增强,从而缓解细胞内多余的自由基对细胞的伤害。同时,表明外源 NO 能有效提高 SOD、CAT 和 POD 的活性,以减轻低温胁迫对山茶的伤害作用。

3 讨论

3.1 外源 NO 对山茶叶片叶绿素含量的影响

植物光合作用中叶绿素在光能吸收、传递和转化过程中

表 4 低温胁迫下喷施外源 SNP 后山茶叶片 H₂O₂ 和 MDA 含量动态变化($\bar{x} \pm s$)

品种名	处理	不同处理时间的 H ₂ O ₂ 含量(μmol/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	0.19 ± 0.01BCb	0.23 ± 0.01Ca	0.19 ± 0.01Bb	0.20 ± 0.01Cb	0.19 ± 0.02Db
	T2	0.18 ± 0.01Cd	0.38 ± 0.01Ac	0.53 ± 0.04Ab	0.61 ± 0.05Ab	0.82 ± 0.09Aa
	T3	0.20 ± 0.01ABd	0.37 ± 0.02Ac	0.50 ± 0.02Ab	0.53 ± 0.04Bb	0.78 ± 0.02Aa
六角大红	T1	0.17 ± 0.01Cc	0.20 ± 0.01Db	0.22 ± 0.01Ba	0.17 ± 0.01Cc	0.18 ± 0.01Dc
	T2	0.20 ± 0.01Ae	0.38 ± 0.01Ad	0.49 ± 0.02Ac	0.56 ± 0.03Bb	0.70 ± 0.03Ba
	T3	0.20 ± 0.01Ad	0.33 ± 0.02Bc	0.49 ± 0.03Ab	0.53 ± 0.03Bb	0.58 ± 0.02Ca

品种名	处理	不同处理时间的 MDA 含量(nmol/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	1.17 ± 0.28Aa	1.27 ± 0.18BCa	1.14 ± 0.18Ca	1.12 ± 0.12Ea	1.18 ± 0.03Ca
	T2	1.12 ± 0.04Ac	1.51 ± 0.09Abc	2.01 ± 0.08Ab	6.59 ± 0.34Aa	6.11 ± 0.57Aa
	T3	1.15 ± 0.02Ab	1.21 ± 0.07BCb	1.50 ± 0.06Bb	4.94 ± 0.25Ca	4.58 ± 0.43Ba
六角大红	T1	1.09 ± 0.28Aa	1.19 ± 0.18BCa	1.06 ± 0.18Ca	1.04 ± 0.12Ea	1.14 ± 0.04Ca
	T2	1.14 ± 0.11Ab	1.42 ± 0.09ABb	1.50 ± 0.06Bb	5.93 ± 0.30Ba	5.50 ± 0.52Aa
	T3	1.13 ± 0.05Ab	1.15 ± 0.07Cb	1.36 ± 0.09Bb	4.25 ± 0.22Da	3.94 ± 0.37Ba

表 5 低温胁迫下喷施外源 SNP 后山茶叶片 SOD、CAT、POD 活性动态变化($\bar{x} \pm s$)

品种名	处理	不同处理时间的 SOD 活性(U/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	91.44 ± 3.36Ab	105.52 ± 0.95Db	100.92 ± 1.02Fa	107.22 ± 2.14Ea	109.17 ± 3.45Ea
	T2	88.79 ± 1.28Ae	116.50 ± 3.48Cd	124.54 ± 3.88Dc	143.48 ± 5.73Db	154.09 ± 3.95Da
	T3	92.23 ± 3.59Ad	139.85 ± 8.36Bc	164.08 ± 7.60Bb	165.17 ± 9.55Cb	181.85 ± 4.94Ca
六角大红	T1	92.71 ± 1.01Ac	99.33 ± 4.97Db	109.93 ± 3.10Ea	109.77 ± 1.42Ea	114.18 ± 4.87Ea
	T2	91.23 ± 8.50Ad	135.81 ± 6.12Bc	146.15 ± 4.36Cc	219.91 ± 4.56Bb	245.20 ± 6.39Ba
	T3	96.49 ± 4.64Ae	177.93 ± 3.12Ad	203.98 ± 4.89Ac	253.45 ± 6.42Ab	287.10 ± 8.02Aa

品种名	处理	不同处理时间的 CAT 活性(U/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	74.59 ± 5.96Bc	85.00 ± 4.33Cb	94.26 ± 2.45Da	92.88 ± 2.32Da	99.08 ± 2.17Fa
	T2	80.99 ± 4.33ABd	109.34 ± 2.16Bc	121.59 ± 3.64Cb	124.00 ± 3.39Cab	128.87 ± 3.57Ea
	T3	85.82 ± 2.60Ad	111.42 ± 8.73Bc	132.32 ± 3.96Bb	146.19 ± 5.44Ba	147.24 ± 4.99Da
六角大红	T1	79.52 ± 4.03ABd	119.76 ± 3.59Bc	132.80 ± 3.63Bb	138.02 ± 3.83Bb	160.12 ± 3.73Ca
	T2	80.67 ± 3.53ABd	119.17 ± 6.29Bc	140.42 ± 6.88Bb	147.92 ± 7.11Bb	235.83 ± 8.51Ba
	T3	76.52 ± 5.96Be	144.63 ± 7.09Ad	195.69 ± 10.41Ac	227.43 ± 8.63Ab	290.42 ± 3.61Aa

品种名	处理	不同处理时间的 POD 活性(U/g)				
		0 h	4 h	12 h	24 h	48 h
花鹤翎	T1	760.00 ± 34.87Ac	762.67 ± 6.11Cc	880.00 ± 16.00Cb	845.33 ± 40.27Cab	925.33 ± 33.31Ca
	T2	793.35 ± 37.62Ad	896.83 ± 16.57Bc	1039.63 ± 19.43Bb	1088.52 ± 20.43Bb	1209.47 ± 56.91Ba
	T3	791.33 ± 42.06Ae	952.00 ± 65.48Bd	1069.33 ± 24.44Bc	1224.00 ± 69.74Ab	1349.33 ± 20.13Aa
六角大红	T1	792.00 ± 24.00Ab	801.33 ± 20.53Cb	837.33 ± 36.95Cb	929.33 ± 28.59Ca	952.00 ± 13.86Ca
	T2	804.33 ± 26.60Ac	948.24 ± 37.65Bb	1040.63 ± 35.53Bb	1200.96 ± 97.94Aa	1230.85 ± 73.52Ba
	T3	759.24 ± 34.84Ae	1054.13 ± 14.42Ad	1154.83 ± 19.65Ac	1274.40 ± 41.15Ab	1346.45 ± 29.10Aa

起着重要作用,因此叶绿素含量是反映植物光合作用能力的一个间接指标^[23]。研究表明,叶绿体对低温敏感性较强,低温处理下植物叶绿体发生膨胀变形、类囊体片层结构紊乱、叶绿体膜出现内吞现象等,伴随着叶绿素含量降低,最终导致光合速率下降^[24]。外源 NO 能提高低温处理下一年生黑麦草^[25]、棉花^[11]、玉米^[26]等植株叶片中叶绿素含量,本试验的研究结果与之一致。此外,外源 NO 在盐胁迫下能维持八宝景天光化学活性^[27],缓解盐胁迫和高温胁迫下水稻叶片叶绿素的降解^[28]。非生物胁迫下,NO 以浓度依赖的方式与活性氧(ROS)清除酶类共同作用应对抗氧化胁迫,或者直接

作为抗氧化剂清除 ROS^[29]。这可能是因为外源 NO 可提高抗氧化酶活性,清除低温胁迫产生的部分 ROS,促进了低温胁迫下山茶类囊体膜蛋白复合体的组装和稳定,缓解了叶绿素的分解,保持叶绿体对光能的吸收和利用,从而促进了光合作用。

3.2 外源 NO 对山茶叶片可溶性物质含量的影响

植物对低温胁迫的响应除了基因表达、膜组成变化、激素合成、抗氧化酶活性变化外,大量可溶性物质如可溶性糖、氨基酸、可溶性蛋白等的积累,增加了细胞液渗透压,提高了细胞吸水和保水能力,避免原生质脱水凝固,从而保护植物细胞

免受低温伤害^[30-31]。脯氨酸是水溶性最大的氨基酸,研究结果表明低温胁迫下脯氨酸可增加酶稳定性,保护酶活性,减轻质膜损伤,清除羟自由基,从而稳定蛋白质、DNA 和细胞膜^[32]。高等植物在逆境胁迫下,脯氨酸的积累是一种常见的生理反应。在植物体内,脯氨酸的合成由谷氨酸或鸟氨酸开始,其中谷氨酸合成途径中, *P5CS* 是该过程的限速酶。近几十年来, *P5CS* 基因反馈调节在控制植物脯氨酸水平上扮演着重要的角色,脯氨酸含量的变化也影响着植物对逆境胁迫的响应^[33-34]。在拟南芥中低温胁迫可通过 *NIA1* 基因的表达促进植物内源 NO 合成,上调 *P5CS* 基因的表达,促进脯氨酸的积累,提高植株的抗寒性。本研究结果表明,外源 NO 处理后的山茶在低温胁迫下,其可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量均显著高于低温胁迫处理的山茶。王芳等用 0.10 mmol/L SNP 处理低温胁迫下的玉米幼苗,其可溶性蛋白和可溶性糖含量分别增加了 19.25%、123.0%,可有效缓解低温胁迫对玉米幼苗生长的抑制效应^[26];杜卓涛等以 0.50 mmol/L SNP 处理苦瓜幼苗时也显著促进了渗透调节物质的合成,提高了低温胁迫下植株生物量,增加了苦瓜的抗冷性^[35],本研究结果与之一致。说明外源 NO 可诱导可溶性糖和可溶性蛋白的积累,减轻低温胁迫对植株造成的伤害,提高植株对低温的适应性。牟雪姣等的研究表明,外源 NO 能够提升常温及低温胁迫条件下蝴蝶兰叶片内的渗透调节物质含量^[36],而本研究及杨美森等在棉花上的研究结果^[11]则表明,常温下外源 NO 处理植株渗透调节物质含量虽有一定的增加但不显著,这可能是使用 SNP 浓度不同或者不同植物对外源 NO 敏感性不同而引起的,其机理有待进一步研究。

3.3 外源 NO 对山茶叶片膜脂过氧化和抗氧化酶活性的影响

逆境胁迫下,植物细胞内 ROS 动态平衡受到破坏,导致 O_2^- 、羟自由基、 H_2O_2 等活性氧迅速积累,活性氧能够与植物体内的蛋白质、DNA 和脂类物质反应,最终对植物体造成伤害^[37]。MDA 则是植物体在衰老或逆境条件下,发生膜脂过氧化作用的最终分解产物,能破坏细胞膜的结构,使细胞内溶物扩散到细胞外,逆境胁迫下会大量积累。SOD、CAT 和 POD 是植物的抗氧化系统重要的保护酶,可保护植物免受活性氧的伤害。NO 可通过增加 SOD、CAT、POD 等抗氧化酶活性来增强细胞抗氧化能力^[28,38-39];外源 NO 在逆境胁迫下可提高植株抗氧化酶活性已在多种植物上得到证实^[9,11,26,34]。本研究中,低温胁迫下, O_2^- 生成速率加快,MDA 和 H_2O_2 的含量显著增加,SOD、CAT 和 POD 的活性明显增强;外源 NO 处理提高了低温胁迫下山茶 SOD、CAT 和 POD 的活性,降低了 MDA 和 H_2O_2 的含量,减缓了 O_2^- 生成速率,缓解了冷害胁迫下膜脂过氧化作用对细胞的伤害,提高了山茶的耐冷性,研究结果与南瓜^[9]、棉花^[11]、玉米^[26]、蝴蝶兰^[34]等的研究结果一致。证明外源 NO 处理确实一定程度上提高了山茶对低温胁迫的适应性。低温胁迫下,导致植物发生一系列的生理生化变化,包括 ROS 动态平衡也受到破坏^[8],而 NO 作为信号分子在逆境胁迫下可通过参与不同的过程基因,如信号转导、防御和细胞死亡、转运、代谢以及 ROS 产生和降解相关基因,以促进 O_2^- 转化成 H_2O_2 和 O_2 ,并且通过增强 H_2O_2 清除酶活性,最终抑制植物的氧化损伤^[40-41]。

4 结论

低温胁迫下,山茶幼苗叶绿素含量显著降低,超氧阴离子自由基增加,膜脂过氧化程度增加,生长受到显著影响。外源施加 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP 溶液,在低温胁迫下显著增加了可溶性物质含量,提高了抗氧化酶 SOD、CAT、POD 活性,降低了 O_2^- 产生速率,减少了 H_2O_2 和膜脂过氧化物产物的积累,最终有效缓解了低温胁迫对山茶花造成的伤害,从而增强了其抗寒性。2 个品种相比,六角大红 O_2^- 生成速率、 H_2O_2 含量和 MDA 含量均低于花鹤翎,而其叶绿素、可溶性物质含量、抗氧化酶活性均显著高于花鹤翎,因此六角大红的抗寒性优于花鹤翎。外源 NO 能提高花鹤翎和六角大红的抗寒性,花鹤翎和六角大红花期不同、抗寒性不同,将花鹤翎和六角大红配合栽植,并施以外源 NO 提高抗寒性,对北方山茶花品种引种以及安全越冬具有一定的指导意义。

除了山茶花具有较高观赏价值以外,山茶属植物都具有很高的利用价值,经济植物茶树是世界三大无酒精饮料之一;油茶组合红山茶组种子含油量高;金花茶组种类繁多,是著名观赏花木,然而这些重要经济植物喜温暖湿润环境,目前主要分布于东亚北回归线两侧。由于木本植物生长慢、育种周期长,外源 NO 处理已有效地提高了山茶的抗寒性,深入研究其在山茶属植物低温胁迫中的作用,对于扩大山茶属植物的分布范围,尤其是其北方分布,对于丰富北方道路、庭院、住宅、景点等花卉品种具有重要意义。

参考文献:

- [1]高继根. 山茶属植物主要原种彩色图集[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2005.
- [2]蓝芳,梁雅仪,王晓峰,等. 高温高湿胁迫对大果山茶生理特性的影响[J]. 湖北农业科学,2017(9):1678-1682.
- [3]彭邵锋,陆佳,陈永忠,等. 高温胁迫下 21 个山茶种质的生理生化响应[J]. 经济林研究,2016,34(3):121-125.
- [4]王奎玲. 耐冬山茶种质资源研究[D]. 北京:北京林业大学,2006.
- [5]Fancy N N, Bahlmann A K, Loake G J. Nitric oxide function in plant abiotic stress[J]. Plant Cell and Environment, 2017, 40(4):462-472.
- [6]Schrawat A, Gupta R, Deswal R. Nitric oxide - cold stress signalling cross - talk, evolution of a novel regulatory mechanism [J]. Proteomics, 2013, 13(12/13):1816-1835.
- [7]Neill S J, Desikan R, Hancock J T. Nitric oxide signalling in plants [J]. New Phytologist, 2003, 159(1):11-35.
- [8]Siddiqui M H, Al - Whaibi M H, basalah M O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress[J]. Protoplasma, 2011, 248(3):447-455.
- [9]吴旭红,吕成敏,冯晶旻. 外源一氧化氮(NO)对低温胁迫下南瓜幼苗氧化损伤的保护效应[J]. 草业学报, 2016, 25(12):161-169.
- [10]Zhao M G, Chen L, Zhang L L, et al. Nitric reductase - dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2009, 151(2):755-767.
- [11]杨美森,王雅芳,干秀霞,等. 外源一氧化氮对冷害胁迫下棉花

- 幼苗生长、抗氧化系统和光合特性的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(15): 3058–3067.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 105–263.
- [13] Yemm E W, Willis A J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone[J]. Biochemical journal, 1954, 57(3): 508–514.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [15] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 278–279.
- [16] Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants[J]. Plant Physiology Communications, 1990, 26: 55–57.
- [17] 刘俊, 吕波, 徐朗莱. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000(5): 548–551.
- [18] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 台北: 艺轩图书出版社, 2009: 274–276.
- [19] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases; I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiology, 1977, 59(2): 309–314.
- [20] Aebi H. Catalase *in vitro*[J]. Methods in Enzymology, 1984, 105: 121–126.
- [21] Kong F X, Hu W, Chao S Y, et al. Physiological responses of the lichen *Xanthoparmelia mexicana* to oxidative stress of SO₂ [J]. Environmental and Experimental Botany, 1999, 42(3): 201–209.
- [22] 李国婧. 超氧阴离子的产生及其在植物体内作用的研究[J]. 生物技术世界, 2012(4): 24–25.
- [23] Li X G, Meng Q W, Jiang G Q, et al. The susceptibility of cucumber and sweet pepper to chilling under low irradiance is related to energy dissipation and water–water cycle[J]. Photosynthetica, 2003, 41(2): 259–265.
- [24] 许楠, 孙广玉. 低温锻炼后桑树幼苗光合作用和抗氧化酶对冷胁迫的响应[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4): 761–766.
- [25] 马向丽, 魏小红, 龙瑞军, 等. 外源一氧化氮提高一年生黑麦草抗冷性机制[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1269–1274.
- [26] 王芳, 李永生, 彭云玲, 等. 外源一氧化氮对玉米幼苗抗低温胁迫的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2017, 35(4): 270–275.
- [27] 陈志新, 陈伟楠, 胡增辉, 等. 一氧化氮对盐胁迫下八宝景天叶片生理特性的影响[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(3): 1–6.
- [28] Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T, et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. Plant Science, 2002, 163(3): 515–523.
- [29] Arora D, Jain P, Singh N, et al. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants[J]. Free Radical Research, 2016, 50(3): 291–303.
- [30] Ma Y, Zhang Y L, Lu J, et al. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(10): 2004–2010.
- [31] Knipp G, Honermeier B. Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(4): 392–397.
- [32] Sinha S, Kukreja B, Arora P, et al. The omics of cold stress responses in plants [M]//Elucidation of abiotic stress signaling in plants. New York: Springer, 2015: 143–194.
- [33] Armengaud P, Thiery L, Buhot N, et al. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features [J]. Physiologia Plantarum, 2004, 120(3): 442–450.
- [34] Chen J B, Wang S M, Jing R L, et al. Cloning the *PvP5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses [J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(1): 12–19.
- [35] 杜卓涛, 商桑, 朱白婢, 等. 外源 NO 对低温胁迫下苦瓜幼苗生长和几个生理指标的影响[J]. 热带作物学报, 2016, 37(3): 482–487.
- [36] 牟雪蛟, 刘理想, 孟鹏鹏, 等. 外源 NO 缓解蝴蝶兰低温胁迫伤害的生理机制研究[J]. 西北植物学报, 2015, 35(5): 978–984.
- [37] 王海波, 黄雪梅, 张昭其. 植物逆境胁迫中活性氧和钙信号的关系[J]. 北方园艺, 2010(22): 189–194.
- [38] Hung K T, Chang C J, Kao C H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(2): 159–166.
- [39] Zhang F, Wang Y, Yang Y, et al. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica* [J]. Plant, Cell & Environment, 2007, 30(7): 775–785.
- [40] Shi Q, Ding F, Wang X, et al. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(8): 542–550.
- [41] Zheng C, Jiang D, Liu F, et al. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 67(1): 222–227.