

外源NO对冷害胁迫下酸枣种子萌发和幼苗叶片AsA-GSH的影响*

麻云霞¹ 王月林² 李钢铁^{1**} 梁田雨¹ 邹苗¹ 闫晶秋子¹ 马慧¹

¹内蒙古农业大学沙漠治理学院 呼和浩特 010018

²内蒙古自治区草原工作站 呼和浩特 010017

摘要 通过人工室内模拟冷害逆境胁迫,采用外源0.1、0.2、0.5 mmol/L一氧化氮(Nitric oxide, NO)供体亚硝基铁氰化钠(硝普钠, SNP)和0.5 mmol/L NO合成酶抑制剂(*L*-NAME)、硝酸还原酶非专一性抑制剂(NaN_3)及NO清除剂(cPTIO)对酸枣(*Zizyphus jujuba* Mill)种子和幼苗叶片进行处理,研究其对冷害胁迫下酸枣种子发芽特性和幼苗抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环系统的影响,为外源NO在未来酸枣抗逆生产中的广泛应用提供理论基础。结果表明:4℃冷害胁迫下,酸枣种子萌发和幼苗生长受到抑制,在施加不同浓度的SNP后能显著增加冷害逆境下酸枣种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数,降低幼苗叶片丙二醛(MDA)和过氧化氢(H_2O_2)含量,同时使脯氨酸(Pro)含量增加,抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)含量和抗氧化酶活性[抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)]显著升高。上述表明外源NO可缓解冷害胁迫对酸枣种子萌发及幼苗生长的抑制作用,且以0.5 mmol/L SNP对冷害逆境的缓解效果最佳,而采用NO清除剂和两种合成抑制剂处理明显减弱NO缓解冷害胁迫的效果。(图7表2参41)

关键词 一氧化氮;冷害胁迫;酸枣;种子;AsA-GSH循环

CLC Q945.78

Effects of exogenous NO on seed germination and AsA-GSH in leaves of *Zizyphus jujuba* seedlings under cold stress*

MA Yunxia¹, WANG Yuelin², LI Gangtie^{1**}, LIANG Tianyu¹, ZOU Miao¹, YAN Jinqiuzi¹ & MA Hui¹

¹ College of Desert Control Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

² Grassland Workstation of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010017, China

Abstract *Zizyphus jujuba* leaves were treated with the exogenous NO donor (sodium nitroferricyanide (III) dehydrate/sodium nitroprusside, SNP at 0.1, 0.2, 0.5 mmol/L), a nitric oxide synthase inhibitor (*L*-NAME), a nitrate reductase non-specific inhibitor (NaN_3) and nitric oxide scavenger (cPTIO) to study their effects on the germination of seeds and the circulation of ascorbate glutathione (AsA-GSH) circulation system during cold stress. We also aimed to provide a theoretical basis for the extensive application of exogenous nitric oxide (NO) in protecting *Z. jujuba* against cold stress. Temperatures of 4℃ inhibited the seed germination and seedling growth of *Z. jujuba*. Applying different concentrations of SNP significantly increased the germination rate, germination potential, germination index and vigor index of *Z. jujuba* seeds. SNP also decreased the contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in seedling leaves. At the same time, proline (Pro), ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH) content and antioxidant enzyme activities [ascorbic peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDAR)] were significantly increased. In conclusion, exogenous NO could alleviate the inhibitory effect of cold stress on the seed germination and seedling growth of *Z. jujuba*, reduce membrane lipid peroxidation caused by cold stress, maintain the stability of AsA-GSH circulatory system, and enhance cold resistance. The optimum concentration of SNP for negating the effects of cold stress was 0.5 mmol/L. When the NO scavenger and two synthetic inhibitors were used, the germination of *Z. jujuba* seeds after NO treatment was inhibited under cold stress. Furthermore, the parameters of membrane lipid peroxidation of seedlings were decreased and the indices of antioxidant enzymes and antioxidant activity were increased. The effect of NO on seed germination and the growth of *Z. jujuba*

收稿日期 Received: 2019-03-19 接受日期 Accepted: 2019-04-30

*林业公益性行业科研专项(201504412)和国家自然科学基金项目(31260202)资助 Supported by the Forestry Industry Research Special Fund for Public Welfare Project of China (201504412) and the National Natural Science Foundation of China (31260202)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: 13848817183@163.com)

seedlings under cold stress were significantly weakened, which further demonstrated the protective effects of NO on *Z. jujuba* seeds and seedlings under cold stress.

Keywords NO; cold stress; *Zizyphus jujuba*; seed; AsA-GSH circulatory system

酸枣 [*Zizyphus jujuba* Mill var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F Chou] 为鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属 (*Zizyphus* Mill.) 植物, 别名棘、棘子、小酸枣、葛针等, 常为灌木和小乔木, 本种原产于我国, 北方地区分布最为广泛, 已有1 100-1 500万年的发展历程, 是栽植起源较早、含有多重营养价值且具有较高科研和经济价值的优势枣种^[1]。酸枣喜温暖干燥的环境, 常生于向阳、干燥山坡、丘陵、岗地或平原。可药用、食用、保健, 枣叶提取出的“酸叶酮”可做叶茶, 同时酸枣也是常用的枣树砧木, 具有抗干旱、耐盐碱的特性, 是开发利用沙荒地、盐碱地的优良经济树种^[2]。但是酸枣大部分是野生生长状况, 因为缺乏系统的培育和管护, 品种好坏各异、良莠不齐, 造成产品加工产出率低下、果实品质较差, 所以现阶段对酸枣资源的利用状况不甚乐观。加之缺乏保护意识, 近40年来开始实行推广酸枣嫁接大枣的技术, 致使酸枣数量迅速下降。所以通过外源物质缓解酸枣逆境伤害, 保证其资源分布和产量品质已成为国内外一个研究热点。

冷害胁迫是自然界中常见的非生物胁迫之一, 也是影响植物地理分布和产量的一个重要环境因子。冷害胁迫易导致植物失水外形萎蔫, 光合结构被破坏, 膜系统紊乱, 机能代谢减缓, 生长发育受阻^[3]。长期低温胁迫是植物经常遭受的环境胁迫因子, 了解其调控的生理机制, 对实践生产非常重要。一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 被公认为是充当“信使”角色的气体活性分子, 参与植株整个生命周期的生理代谢和机能转换过程, 是目前植株抗逆防御和体内信号译解网络的探索热点, 1992年被《Science》评为“明星分子”^[4-5]。已有研究表明外源NO能够通过增强植物的抗氧化防护和渗透调节能力, 维持K⁺、Na⁺的平衡, 提高苧麻 (*Boehmeria nivea*) 的耐盐性^[6]; 同时NO能诱导植物体内产生谷胱甘肽 (GSH)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -ECS) 和金属硫蛋白 (MTs), 并通过调控氧化型谷胱甘肽 (GSH-GSSG) 的氧化还原状态和GSH-PCs代谢方向的改变, 促进Cu²⁺、Cd²⁺转运至液泡区隔离来缓解重金属胁迫抑制, 降低其生物毒性^[7]; Caro和Puntarulo^[8]注意到NO还能够使大豆 (*Glycine max*) 胚轴微粒体超氧阴离子的发散频率急速下降, 证明NO可以于胞内发挥氧化与抗氧化两种功效。此外, 研究表明外源NO可以促进竹子 (*Bambusoideae*)^[9]、霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense*)^[10]、苜蓿 (*Medicago sativa*)^[11]、黑麦草 (*Lolium multiflorum*)^[12]、向日葵 (*Helianthus annuus*)^[13]等多种植物的抗逆性。目前酸枣在市场上需求量较大, 相关产业优化改良是市场发展必然趋势, 同时酸枣本身为适暖生存, 抗寒性较差, 频繁冷害会对其植株生长和果实采收造成较大影响。所以, 增强酸枣抗寒性能, 保障其安全越冬, 阐明酸枣对低温的抗性生理机制在实际生产和基础研究方面具有重要意义。但是, 目前对NO的研究多集中在逆境环境下禾谷类作物与蔬菜类作物生长特性方面, NO对低温胁迫下果树的研究仅有柑桔 (*Citrus reticulata*)^[14]、枇杷 (*Eriobotrya japonica*)^[15]

及麻疯树 (*Eriobotrya japonica*)^[16]等个别树种, 而NO解决酸枣因低温胁迫而造成生长不良方面还未见报道。鉴于此, 本研究针对酸枣在实际生产发育中遇到的冷害逆境问题, 以新的植物生长调节信号分子NO为着手点, 探索外源NO处理对冷害胁迫下酸枣种子萌发和幼苗叶片ASA-GSH生理特征的影响, 旨在明确NO对酸枣抗寒性的可能作用机制, 为外源NO在缓解酸枣冷害胁迫方面的应用提供理论基础和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

供试材料为酸枣, 种子由巴彦淖尔市林业科学研究所提供。NO供体硝普钠 (亚硝基铁氰化钠, Sodium nitroprusside, SNP, 生产于Sigma公司), 现用现配。L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl esterhydrochloride)、NaN₃、cPTIO (2-4-carboxyphe-ny-4,4,5,5-tetramethy-limidazolin-1-oxyl-3-oxide potassium salt) 均来自于Sigma公司生产。试验于2017年8月开始在内蒙古农业大学科教示范园区实验室内开展。

1.2 试验方案

1.2.1 种子培养 选择外表光滑、健康饱满的种子, 将种皮上的附着物去除, 用0.6%次氯酸钠 (NaClO) 溶液进行5 min的消毒过程, 再用无菌水漂洗2-3遍, 在蒸馏水中浸泡12 h, 之后用滤纸吸走种子外部多余残液整齐摆入放有5层滤纸的培养箱内开始进行正规发芽试验。

1.2.2 试验设置 选取采用Hoagland营养液为基础液进行配置, 在前期预试验的基础上, 共设8个处理, 如表1所示。

表1 试验处理

Table 1 Experimental treatments

编号 Number	处理 Treatment
CK1	常温25 ℃ + 蒸馏水 Distilled water
CK2	低温4 ℃ + 蒸馏水 Distilled water
T1	低温4 ℃ + 0.1 mmol/L SNP
T2	低温4 ℃ + 0.2 mmol/L SNP
T3	低温4 ℃ + 0.5 mmol/L SNP
T4	低温4 ℃ + 0.5 mmol/L SNP + 0.5 mmol/L L-NAME
T5	低温4 ℃ + 0.5 mmol/L SNP + 0.5 mmol/L NaN ₃
T6	低温4 ℃ + 0.5 mmol/L SNP + 0.5 mmol/L cPTIO

各个处理水平6次重复, 每个重复包含50粒酸枣种子, 置于温度为20 ℃、相对湿度60%-75%的黑暗环境中催芽培养24 h, 然后试验分成两个步骤进行:

(1) 在除去对照1 (CK1) 组的前提下, 将其余组的3个重复置于无光照、4 ℃低温的环境中开始冷害处理, 每天同一时间浇灌处理液, 在培养期到达第8天开始, 每48 h记录一次酸枣的发芽情况。

(2) 在除去对照1(CK1)组的前提下, 将其余组的另外3个重复放于温度为28℃、光照长度为12 h/d的恒温箱内进行催芽处理, 第8天在浸种催芽好的种子内选取根芽均匀一致、长势较好的芽苗移栽到口径为10 cm、高25 cm且装有草炭:蛭石为1:1基质的塑料花盆中, 每天同一时间施加其对应处理液和Hoagland基础营养液, 到第15天放于温度为1℃的无光照环境内培育一天一夜, 之后再置于温度为4℃、光照长度为12 h/d的恒温箱中进行处理, 待酸枣幼苗长到三叶一心时选择长势均匀的幼苗开始对第0-8天培养期内叶片丙二醛(MDA)、过氧化氢(H₂O₂)、脯氨酸(Pro)含量及抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环系统的相关指标进行测定^[17]。

1.3 项目测定

1.3.1 种子发芽特性 于处理后每隔1 d观察发芽情况并记录各处理的发芽数, 发芽标准为胚根长达1-2 mm, 统计发芽率, 同时测定芽苗鲜重, 并计算发芽势、发芽指数和活力指数, 计算公式如下:

$$\text{发芽势 (GE)} = N_m/N_0 \times 100\%;$$

$$\text{发芽率 (GEP)} = N_t/N_0 \times 100\%;$$

$$\text{发芽指数 (GI)} = \sum G_t/D_t;$$

$$\text{萌发活力指数 (VI)} = \sum D_t/D_t \times S.$$

式中, N_t 为萌发种子数, N_0 为供试种子数, N_m 为种子发芽达到最高峰时种子发芽数, G_t 为时间 t 的发芽数(粒), D_t 为相应的发芽时间(d), S 为芽苗的鲜质量(g)。

1.3.2 幼苗叶片AsA-GSH系统生理指标 过氧化氢(H₂O₂)含量测定参照邹琦的方法^[18]; 丙二醛(MDA)测定使用硫代巴比妥酸法; 脯氨酸(Pro)采用酸性茚三酮显色法的方法^[19]测定; 还原型抗坏血酸(AsA)和GSH(谷胱甘肽)含量根据陈建勋的方法^[20]测定; 抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定采用Rao等的方法^[21], 以1 min内OD_{290 nm}变化0.01定义为APX的1个酶活性单位, 以1 min内OD_{340 nm}变化0.01定义为GR的1个酶活性单位; 脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性测定采用宋松泉等的方法^[22], DHAR活性(AsA/prot)用 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 表示, MDAR活性(NADH/prot)用 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

表示, 每个指标均设定3个重复, 最后以平均值为准。

1.4 数据分析

试验所得数据使用 Microsoft Office Excel 2007 软件进行处理和制图, SPSS 21.0软件进行差异显著性方差分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 外源NO对酸枣种子发芽特性的影响

2.1.1 外源NO对冷胁迫下酸枣种子发芽率和发芽势的影响 从图1、图2中可以得出, 冷害逆境下, 酸枣种子的发芽率与CK1对照组比较, 第8、10、12、14、16天分别显著降低了78.79%、61.11%、57.50%、42.86%、39.13% ($P < 0.05$), 发芽势下降了37.50% ($P < 0.05$), 表明4℃冷害逆境降低了酸枣种子的萌发能力, 延迟了种子的萌发。在4℃低温施用外源物质SNP后, 不同浓度的SNP对酸枣种子的萌发起到了一定的缓解作用, 且随着浓度的增大, 缓解效果越来越突出, 发芽率和发芽势开始出现回升, 且在同一浓度下, 随着萌发天数的增加, 种子发芽率和发芽势仍整体呈现上升趋势, 在施用0.5 mmol/L的SNP时, 效果达到最好, 发芽率在第8、10、12、14、16天与CK2相比分别显著提高了68.18%、54.84%、50.00%、38.46%、37.08% ($P < 0.05$), 但仍低于CK1, 表现出明显的低温影响, 而在NO合成酶抑制剂L-NAME、硝酸还原酶非专一性抑制剂NaN₃和NO清除剂cPTIO处理下, 其发芽率和发芽势并未出现缓解效果, 甚至继续呈现下降趋势。

2.1.2 外源NO对冷胁迫下酸枣种子发芽指数和活力指数的影响 从图3和图4可以看出, 冷害胁迫对酸枣种子萌发指数和活力指数产生了抑制作用。在4℃低温的处理下, 种子萌发指数与CK1相比下降了62.85%、67.64%、45.89%、61.50%、55.88%, 活力指数比CK1下降了80.63%, 差异均显著 ($P < 0.05$)。在施用SNP后, 酸枣种子的发芽指数和活力指数均出现不同程度的回升, 说明其对不同浓度的NO敏感性不同, 且种子的发芽指数在0.5 mmol/L SNP处理下效果最佳, 在第8、10、12、14、16天比CK2分别显著提高了68.18%、54.84%、50.00%、38.46%、37.08% ($P < 0.05$), 说明在冷害逆境下, 外

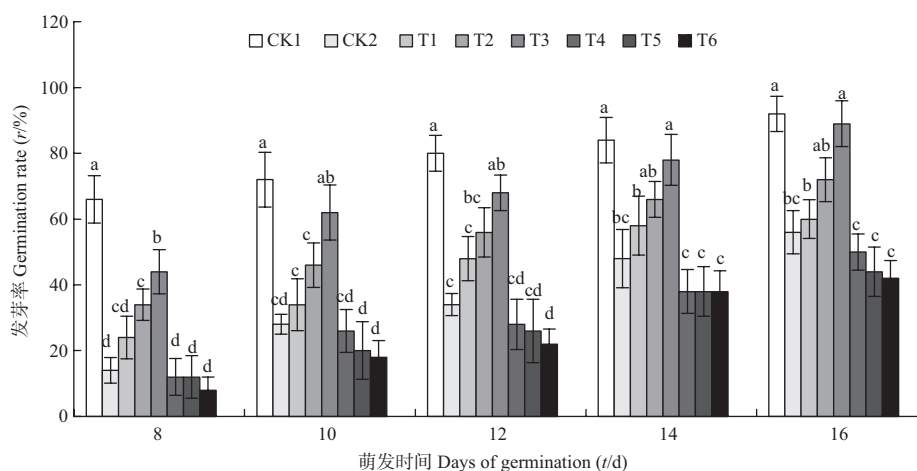


图1 外源NO对冷胁迫下酸枣种子发芽率的影响。不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平。

Fig. 1 Effect of exogenous nitric oxide on germination rate of *Zizyphus jujuba* seeds under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

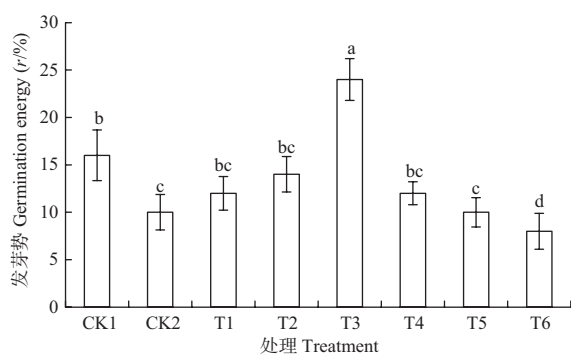


图2 外源NO对冷害胁迫下酸枣种子发芽势的影响. 不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平.

Fig.2 Effect of exogenous nitric oxide on germination potential of *Zizyphus jujuba* seeds under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

施SNP种子发芽速度、发芽整齐度均优于无外施外源物情况. 种子活力指数在施用不同浓度的SNP后与萌发指数变化趋势相同, 分别比CK2提高了35.59%、97.75%、120.63%, 差异均显著 ($P < 0.05$), 而NO合成酶抑制剂L-NAME、硝酸还原酶非专一性抑制剂NaN₃和NO清除剂cPTIO并不能显著消除冷害胁迫对酸枣种子发芽指数和活力指数的负面作用.

2.2 外源NO对酸枣幼苗叶片AsA-GSH循环系统的影响

2.2.1 外源NO对冷害胁迫下酸枣幼苗叶片膜脂过氧化的影响

图5显示, H₂O₂在4℃冷害胁迫下出现显著升高, 在第0、2、4、6天分别比CK1提高了36.25%、42.37%、43.57%、44.90% ($P < 0.05$), 在施用SNP后, H₂O₂含量开始出现不同程度的下降, 酸枣幼苗叶片H₂O₂含量对应不同浓度SNP处理从高到底顺序依次为0.1 mmol/L SNP > 0.2 mmol/L SNP > 0.5 mmol/L SNP. 整体看来, 恢复时间内施加0.5 mmol/L SNP下的酸枣幼苗所含H₂O₂总量下滑幅度最大, 比CK2分别下降了21.77%、22.18%、15.65%、25.42%, 虽未达到显著差异水平 ($P < 0.05$), 但高于CK1处理下H₂O₂的含量. CK1、CK2与不同浓度SNP组下幼苗的H₂O₂累积量根据时间的推移均显现为持续降低趋势, 表明冷害逆境导致酸枣幼苗叶片中H₂O₂的大量堆

积, 引发植株膜脂过氧化现象和膜损伤, 在施加NO的情况下能抑制逆境中酸枣胞内H₂O₂的总量的增长, 减轻H₂O₂对植株发育产生的负面效应. 在施加L-NAME、NaN₃和cPTIO后, H₂O₂积累量开始增加, 且整体高于CK2, 说明SNP的缓解作用被消除.

在室温正常生长条件下(CK1), 酸枣幼苗叶片MDA含量最低, 受低温胁迫后, 过氧化产物MDA含量显著增加, 在第0、2、4、6天分别比CK1增加350.00%、140.00%、100.00%、100.00% ($P < 0.05$), 说明低温胁迫造成酸枣幼苗叶片膜脂过氧化加速, 施加SNP处理后, 细胞内MDA总量根据SNP浓度的上升呈现出减小的趋势, 外源SNP浓度为最大值0.5 mmol/L时, MDA总量与单一冷害逆境比较分别降低了66.67%、50.00%、44.44%、45.00% ($P < 0.05$), 说明加入SNP后, 使酸枣幼苗叶片膜脂过氧化程度降低, 而其他外源物处理幼苗叶片的MDA含量从高到低排序依次为cPTIO > NaN₃ > L-NAME, 说明施加NO清除剂或两种抑制剂促进冷害逆境下酸枣叶片内MDA累积量的上升, 酸枣对不利逆境的抵抗应答机制在一定程度上开始出现紊乱, 致使不良环境对植株产生的毒害作用更加强烈, NO清除剂cPTIO效果体现最为明显, 进一步证明外源NO对冷害逆境中酸枣植株的抗氧化性产生了一定的调控效应.

图5表明, 4℃冷害逆境处理下, Pro含量开始上升, 随着时间的推移, 酸枣植株中Pro总量呈持续升高趋势且均低于CK1处理组, 分别上升了1.82%、37.27%、41.74%、65.71%, 在第0天无显著差异 ($P > 0.05$), 在第2、4、6天均形成显著差异 ($P < 0.05$). 当低温胁迫下外施SNP处理后, 幼苗Pro继续呈上升趋势, 与低温处理相比, 在浓度为0.5 mmol/L时Pro含量上升最显著, 第0、2、4、6天分别比CK2上升了52.45%、54.48%、59.46%、67.04% ($P < 0.05$), 同时, 在第6天时, 0.1 mmol/L SNP、0.2 mmol/L SNP、0.5 mmol/L SNP处理的酸枣幼苗叶片Pro含量比常温对照苗分别增加了121.13%、146.16%、176.79%, 差异均显著 ($P < 0.05$). 由此可见外源NO能促进植物体内游离Pro累积量的增加, 保证细胞正常膨压, 减轻外界

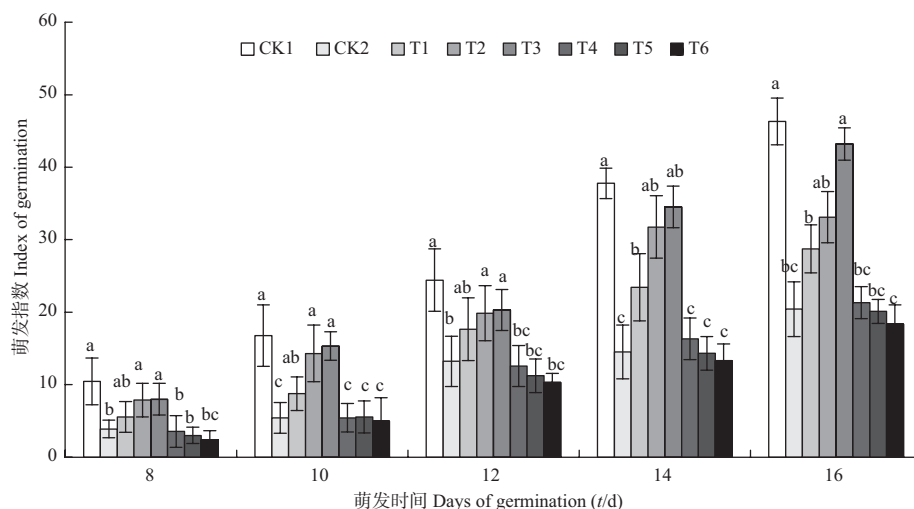


图3 外源NO对冷害胁迫下酸枣种子萌发指数的影响. 不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平.

Fig. 3 Effects of exogenous nitric oxide on germination index of *Zizyphus jujuba* seeds under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

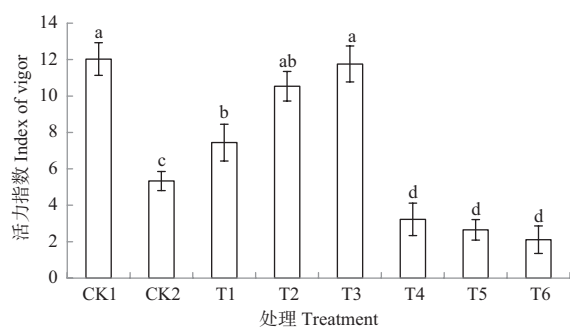


图4 外源NO对冷胁迫下酸枣种子活力指数的影响. 不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平.

Fig. 4 Effect of exogenous nitric oxide on vigor index of *Zizyphus jujuba* seed under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

不利因素对植株造成的氧化伤害, 调节胞内新陈代谢秩序. NO清除剂或抑制剂的各处理使Pro积累量下降, 降低了对原生质的保护作用.

2.2.2 外源NO对冷胁迫下酸枣幼苗叶片AsA和GSH含量的影响 由图6可知, 与CK1相比, 低温胁迫下酸枣叶片AsA含量在第0天与CK1相比出现略微上升, 在第2、4、6天分别显著下降了45.04%、41.19%、39.33% ($P < 0.05$), 施加不同浓度SNP后酸枣幼苗AsA总量开始回升, 且CK1、CK2与SNP各组下的酸枣植株内AsA总量根据时间的推移均显示为持续升高状态, 表明0.1-0.5 mmol/L的SNP对酸枣叶片AsA含量的提高有不同程度的促进作用, 在第6天不同SNP处理下浓度均达到最高, 在各个时间梯度下, 施加0.5 mmol/L SNP组的酸枣

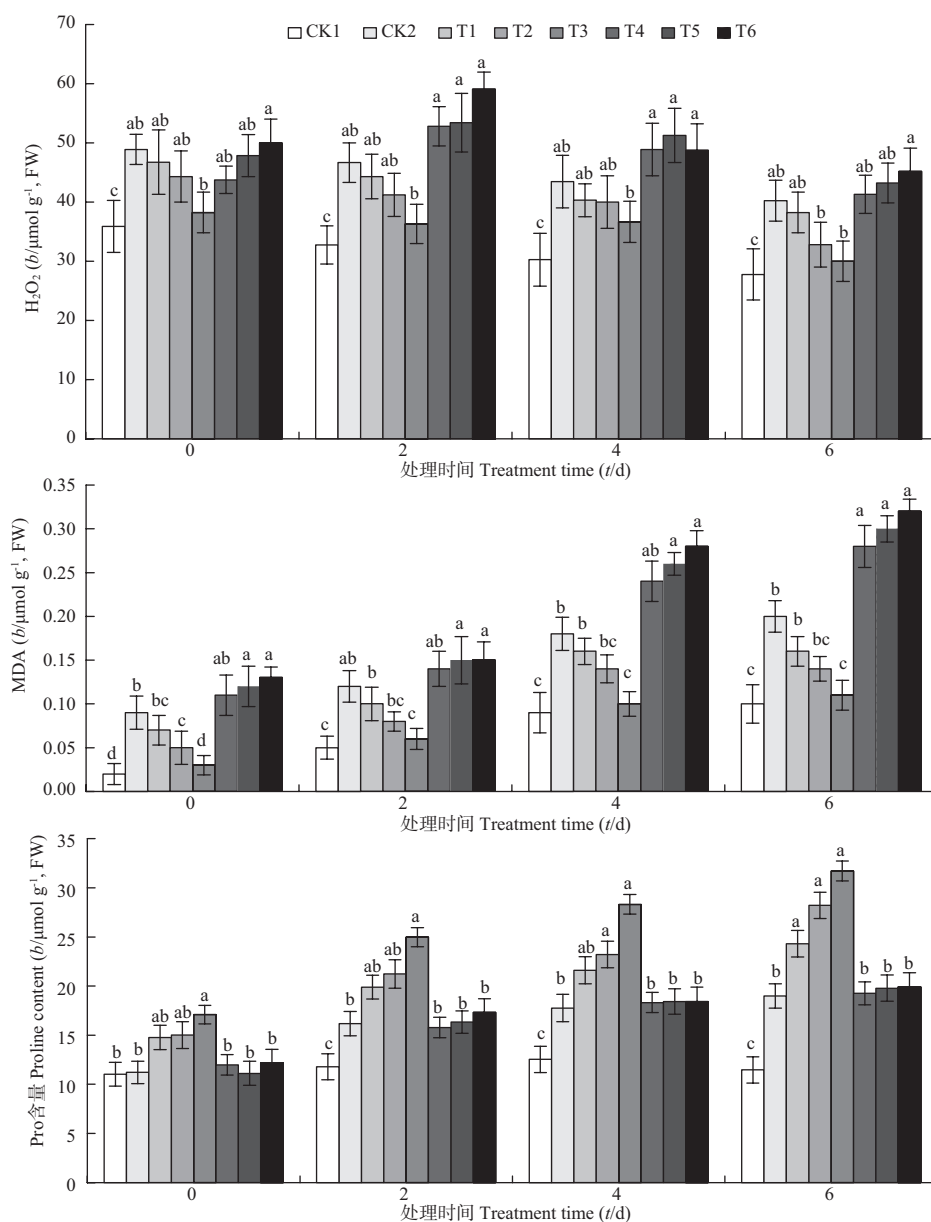


图5 外源NO对冷胁迫下酸枣幼苗叶片膜脂过氧化的影响. 不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平.

Fig. 5 Effect of exogenous nitric oxide on membrane lipid peroxidation in leaves of *Zizyphus jujuba* seedlings under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

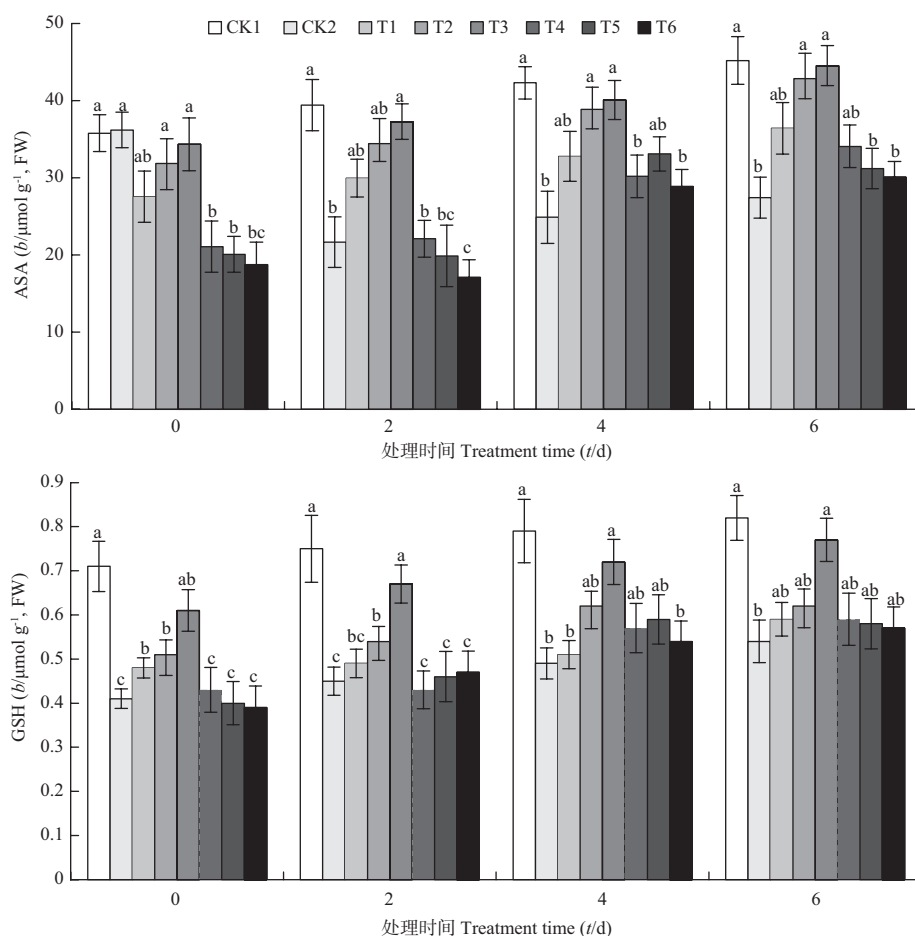


图6 外源NO对冷胁迫下酸枣幼苗叶片AsA和GSH含量的影响。不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平。

Fig. 6 Effect of exogenous nitric oxide on the contents of AsA and GSH in leaves of *Zizyphus jujuba* seedlings under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

植株内AsA总量与其他浓度相比为最高, 且在第2、4、6天比CK2分别提高了72.08%、61.11%、62.41% ($P < 0.05$)。但SNP各处理之间AsA含量差异均不显著 ($P > 0.05$)。因此, 喷施0.5 mmol/L SNP有利于提高低温胁迫下酸枣幼苗AsA产物的合成, 从而提高酸枣的抗寒性。

从图6可以看出, 与CK1相比, 低温胁迫下酸枣叶片GSH含量显著下降了42.25%、40.00%、37.97%、34.15% ($P < 0.05$)。第0、2、4、6天的酸枣幼苗叶片GSH含量对应不同浓度SNP处理从高到底顺序依次为0.5 mmol/L SNP > 0.2 mmol/L SNP > 0.1 mmol/L SNP, 且SNP各处理下叶片的GSH含量均高于CK2, 经0.5 mmol/L SNP处理的酸枣叶片GSH含量分别比CK2高48.78%、48.89%、46.94%和42.59%, 差异达显著水平 ($P < 0.05$)。表明经SNP处理可提高低温胁迫下酸枣幼苗GSH总量, 且施加L-NAME、NaN₃和 cPTIO后, AsA和GSH含量出现下降, 说明NO促使酸枣幼苗叶片中AsA和GSH累积量明显升高, 但NO清除剂或合成抑制剂可以明显消除冷害逆境下经外源SNP处理促使胞体内AsA和GSH总量增加的抗寒效应。

2.2.3 外源NO对冷胁迫下酸枣幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

由图7可知, CK2处理下酸枣幼苗叶片的APX活性低于

CK1, 分别显著下降了66.45%、64.65%、69.81%、71.79% ($P < 0.05$)。表明低温胁迫对酸枣幼苗叶片APX活性具有抑制作用。在低温胁迫下经SNP处理后, 酸枣幼苗APX活性开始上升, 但在时间梯度上, 同一浓度的SNP处理下APX随着恢复日期的增加其活性呈下降趋势, CK1则无明显变化规律, 酸枣幼苗叶片APX含量对应不同浓度SNP处理从高到底顺序依次为0.5 mmol/L SNP > 0.2 mmol/L SNP > 0.1 mmol/L SNP, 在第0、2、4、6天的0.5 mmol/L SNP处理下的APX活性比CK2提高了164.85%、159.07%、133.87%、132.95%, 差异达显著性水平 ($P < 0.05$)。说明施加不同浓度的NO均能有效提升冷害逆境下酸枣植株体内的APX活性, 施加L-NAME、NaN₃和 cPTIO则并无此相同效果。

由图7能够得出, 在不同时间梯度下, CK1处理下植株叶片中酶活性均处于较低水平, 且低温处理下的酸枣幼苗叶片的GR活性均高于CK1, 分别上升了10.64%、15.25%、6.49%、13.48%, 但差异并不显著 ($P > 0.05$)。在低温胁迫施加SNP处理后, 各SNP处理下的酸枣叶片GR活性均呈上升趋势, 其中以0.5 mmol/L SNP处理下GR活性上升最为明显, 在第0、2、4、6天的酸枣叶片GR活性与CK2相比分别上升了71.15%、60.29%、51.22%、32.67% ($P < 0.05$)。随着恢复时间的延长,

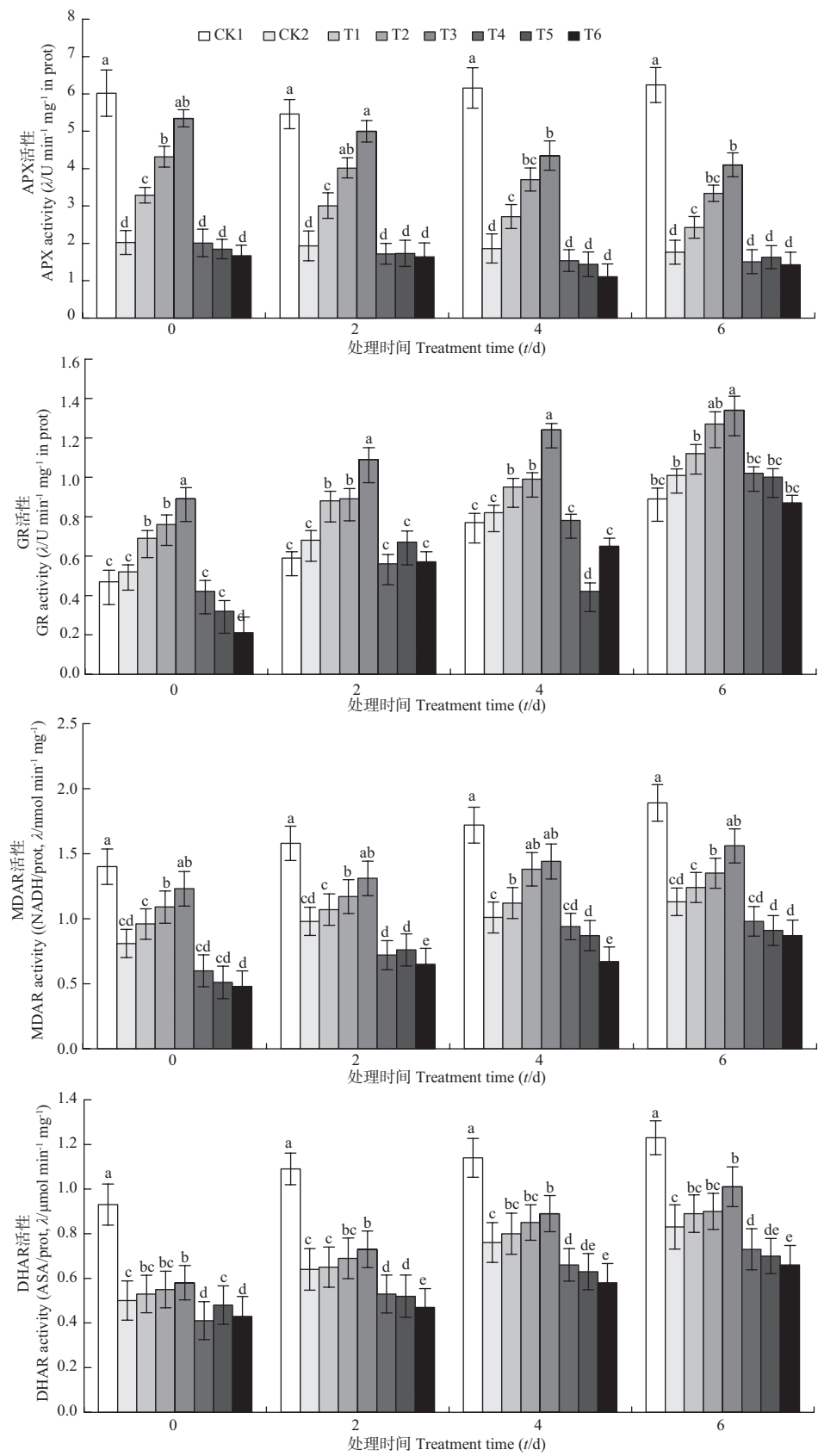


图7 外源NO对冷胁迫下酸枣幼苗叶片抗氧化酶活性的影响. 不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平.
Fig. 7 Effect of exogenous nitric oxide on antioxidant enzyme activities in leaves of *Zizyphus jujuba* seedlings under cold stress. Different small letters in the figure mean significant difference among the treatments at 0.05 level.

恢复速率在不断下降,但各SNP处理的酸枣叶片GR活性仍大于CK2,表明施加NO可使冷害逆境下酸枣幼苗中的GR活性明显上升,降低体内活性氧的大量堆积,且在0.5 mmol/L SNP施加组的作用下成效最为突出,施加L-NAME、NaN₃和cPTIO后,GR活性开始下降,说明施加SNP抵抗酸枣低温逆境伤害的作用被抑制。

如图7所示,冷害逆境下CK2组酸枣幼苗叶片中MDAR的酶水平明显低于常温环境组,分别下降了42.14%、60.00%、71.00%和40.21% ($P < 0.05$),在冷害逆境下施加外源物质后酸枣幼苗内MDAR活性开始出现回升现象,而0.1 mmol/L SNP处理的MDAR活性与CK2差异未达显著水平 ($P > 0.05$),证明施加0.1 mmol/L SNP并未对酸枣幼苗内MDAR活性产生明显的调节效应,在恢复期内,MDAR活性在第6天达到最高,不同SNP处理浓度下,0.5 mmol/L SNP效果最好,在第0、2、4、6天比CK2分别显著提高了51.85%、39.80%、42.57%和38.05% ($P < 0.05$),施加L-NAME、NaN₃和cPTIO后植株叶片MDAR活性开始下降且低于CK2,综上说明冷害逆境对酸枣幼苗体内的MDAR活性产生了明显的负面效应,不同浓度的SNP外源物施加则对叶片内的MDAR活性能产生不同程度的调节作用,提升抗氧化水平。

从图7可知,CK2处理下酸枣幼苗DHAR活性相比CK1下降了46.24%、41.28%、36.84%和34.96% ($P < 0.05$),且在施加SNP的时期内,酸枣幼苗内DHAR活性表现为持续提升状态,在第6天达到最大。在第0、2、4、6天施加0.1 mmol/L SNP处理下的酸枣幼苗DHAR活性与CK2相比未达到显著水平 ($P > 0.05$),在0.5 mmol/L SNP处理下DHAR活性达到最大值,相比CK2显著提高了16.00%、14.06%、17.11%和21.69% ($P > 0.05$),但仍低于CK1,在同一时间梯度下酸枣DHAR活性对应不同浓度SNP处理从高到底顺序依次为0.5 mmol/L SNP > 0.2 mmol/L SNP > 0.1 mmol/L SNP,表明SNP处理可提高低温胁迫下酸枣叶片的DHAR活性。而L-NAME、NaN₃和cPTIO并不能显著消除低温胁迫对酸枣幼苗叶片DHAR活性的负面作用,降低了酸枣幼苗对低温胁迫的耐受性。

2.2.4 酸枣幼苗叶片耐寒性指标间的相关分析 由表2可知,H₂O₂和AsA、GSH、APX、GR、MDAR和DHAR呈极显著负相关,MDA和APX呈极显著负相关,和MDAR呈显著负相关,Pro和AsA呈显著正相关,和GR呈极显著正相关,AsA和GSH、APX、GR、MDAR和DHAR呈极显著正相关,GSH和APX、GR、MDAR和DHAR呈极显著正相关,APX和MDAR、

DHAR极显著正相关,MDAR和DHAR极显著正相关,其中以MDAR和DHAR的相关系数最高,高达0.924。以上结果在一定程度上解释了酸枣幼苗叶片主要成分变化的内在联系,从相关关系可看出,植物受到胁迫时各项生理指标协调应对逆境,互相影响,共同作用。

3 讨论

种子萌发是植株生长发育过程中生命力最为活跃的阶段,也是最易受到外界因素影响的脆弱时期,这一过程中种子对外界的适应能力决定植物是否能够成功建苗和正常生长发育,所以萌发期种子的生长状况至关重要。NO与植物逆境响应和抗病防御反应等过程密切相关,在植物抗性中的作用也越来越受到重视。目前有研究表明NO在逆境环境下对水飞蓟 (*Silybum marianum*)^[23]、翅碱蓬 (*Suaeda salsa*)^[24]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[25]、水稻 (*Oryza sativa*)^[26]等植物种子萌发的促进作用已得到证实。本研究表明4℃的冷害胁迫明显降低了酸枣种子的萌发能力,外施不同浓度(0.1、0.2、0.5 mmol/L)的SNP使冷害逆境下酸枣种子的发芽率、发芽势、发芽指数及种子活力都显著上升,这与Jhanji等对油菜 (*Brassica napus*) 种子^[27]、于秀针等对番茄 (*Solanum lycopersicum*) 种子^[28]的研究中得出的结论一致。且随着浓度的升高,缓解作用明显增强,其中以0.5 mmol/L的SNP处理效果最好,但其缓解效应被外施同等浓度抑制剂L-NAME、NaN₃及NO清除剂cPTIO所缓解。因此,表明施加SNP外源物可以增强冷害逆境下酸枣种子的生命活性和发芽程度,进而提升酸枣萌芽时期的耐寒性,且在低温胁迫下选择适宜浓度的SNP是研究重点。

MDA和H₂O₂是体现膜脂过氧化作用的突出标志物,其总量的高低直接体现了细胞膜的受损程度和对低温胁迫的缓解效果。樊怀福等在试验中发现在低温胁迫下喷施一定NO供体SNP可抑制膜脂过氧化产物MDA及H₂O₂的大量堆积,保证膜系统完整性,缓解冷害逆境对幼苗的膜脂过氧化损伤^[29]。本研究中,冷害逆境处理下酸枣幼苗叶片内MDA和H₂O₂总量过剩,出现冻害损伤,在施加NO后酸枣植株内MDA、H₂O₂总量开始下降,表明外源NO处理可缓解低温胁迫引起的膜脂过氧化伤害,对维持植物的正常代谢有一定的积极作用。同时在冷害逆境下,植株内一部分小颗粒有机物会产生聚积现象进而调控物质循环转换和渗透调节,降低外

表2 冷害胁迫下酸枣幼苗叶片各生理指标的相关性

Table 2 Correlation between physiological indexes of leaves of *Zizyphus jujuba* seedlings under cold stress

生理指标 Physiological factor	H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	MDA含量 MDA content	Pro含量 Pro content	AsA含量 AsA content	GSH含量 GSH content	APX活性 APX activity	GR活性 GR activity	MDAR活性 MDAR activity	DHAR活性 DHAR activity
H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	1								
MDA含量 MDA content	0.348	1							
Pro含量 Pro content	-0.279	0.209	1						
AsA含量 AsA content	-0.841**	-0.202	0.402*	1					
GSH含量 GSH content	-0.828**	-0.160	0.296	0.850**	1				
APX活性 APX activity	-0.773**	-0.728**	-0.027	0.686**	0.746**	1			
GR活性 GR activity	-0.588**	0.090	0.840**	0.628**	0.526**	0.255	1		
MDAR活性 MDAR activity	-0.895**	-0.392*	0.283	0.871**	0.899**	0.840**	0.599**	1	
DHAR活性 DHAR activity	-0.865**	-0.149	0.251	0.805**	0.892**	0.662**	0.539**	0.924**	1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

界不良因素对植株生长产生的负面效应, 研究结果显示低温使植株Pro含量上升, 这与相昆等对核桃 (*Juglans regia*)^[30]、李彩霞等对茄子 (*Solanum melongena*)^[31]、陈润娟等对野生早熟禾 (*Poa pratensis*) 幼苗^[32]的研究结论一致, 而与陈银萍对玉米幼苗的研究结果^[17]有所差异, 本研究结果与此相悖的原因可能是与植物物种、器官、发育阶段、胁迫处理的方式、浓度和时间等有关。且本研究发现在4℃低温胁迫下添加SNP可进一步增加酸枣幼苗叶片中Pro含量, 说明外施NO可在酸枣生长受到不良因素的干扰下通过渗透调节物质来调控细胞渗透压, 增强植株对低温伤害的防御能力, 而L-NAME、NaN₃和cPTIO并无与NO相似的缓解功能。

AsA-GSH功能运转是植株细胞内对H₂O₂直接作用的酶促诱导系统^[33]。AsA和GSH是植株体内AsA-GSH系统内必要的抗氧化剂和氧化还原态势调控师, 表达细胞内的还原能力和还原状态对逆境情况的响应程度。吴锦程研究发现, NO处理可提高低温胁迫下枇杷 (*Eriobotrya japonica*) 叶片的GSH和AsA含量, 且在恢复期内, CK组和不同浓度的SNP施加组枇杷幼苗GSH的富集量随时间的变化显示为不断增加的趋势^[34]。本研究表明, 酸枣幼苗叶片在低温胁迫下GSH呈下降趋势, 而低温胁迫下AsA呈现先上升后下降的趋势, 可能是因为逆境初期, 植物有一个应激保护反应, 外施NO后, 酸枣幼苗叶片GSH和AsA含量均开始上升, 说明外源NO处理可消除冷害逆境下植株体内堆积的大量膜脂过氧化产物, 加强植株幼苗抵御不良环境的性能和体内自主修复的机能。APX活性的平衡对维持较高的AsA含量是非常重要的, 低温逆境使酸枣植株叶片内APX活性开始出现下滑趋势, 在最开始遭遇逆境危害时, 外界环境会促进植物叶片中光合结构、呼吸结构及质外体中H₂O₂的大量产生, 并对APX的活性产生强烈的抑制作用, 且酸枣实生苗中APX本身对胁迫敏感, 这可能是低温胁迫下酸枣实生苗叶片中APX活性下降的重要原因。大量的试验证明一定剂量的NO可起到和抗氧化剂相似的作用并减轻氧化伤害, 有助于抗氧化酶基因更完整的表达^[35-36]。Xiang等人也在试验中进一步证实了NO对活性氧产生的抑制作用及加强APX基因有效表达的功能^[37]。试验过程显示后期施加SNP后酸枣幼苗APX含量上升, 原因可能就是NO通过提高低温胁迫下酸枣幼苗叶中APX抗氧化酶基因的表达, 从而提高抗氧化酶的活性。Uchida等人试验结论显示外施NO可调控GR酶活性水平的上升, 使GSSG转换成GSH, 维持细胞内氧化还原稳态且能进一步诱导抗氧化酶基因的表达, 提高酶活性^[38]。本研究中低温胁迫下酸枣GR活性与CK1处理下相比含量略微上升, 但并未达到显著水平 ($P > 0.05$), 在施加SNP后, GR含量继续呈上升趋势, 且浓度越高上升幅度越大, 这与杨美森对棉花的研究结论^[39]较为相似。且外施NO对冷害逆境下酸枣叶片中MDAR活性的提升有较大的促进作用, 而DHAR活性并没有受到显著的调控效应, 这说明在AsA-GSH系统内AsA的再生这一机能运转中, MDAR催化是一关键环节, 这一结论和在枇杷幼果^[40]和番茄叶及根中^[41]比较研究所得出的MDAR为再生AsA主要酶的研究结论基本相同。以上过程显示, NO处理对酸枣叶片GR、APX和MDAR酶活性以及GSH和AsA含量具有明显的调节作用, 且相关性分析研究表明他们之间在低温胁迫后酸枣生长恢复过程中

的作用存在相互协调的关系。经NO施加叶片中GSH总量的提升和GR活性水平的增长密不可分, 而AsA累积量的提高得益于MDAR的再生功能, GSH、AsA抵抗氧化胁迫伤害需要APX酶的协调作用, 随着恢复时间的延长, AsA-GSH循环代谢逐步得到恢复, 其中以0.5 mmol/L SNP处理的效果最为理想。但0.5 mmol/L为本研究SNP最大浓度, 若继续提高SNP浓度是否具有更好的缓解效应, 将在后续工作中继续探讨。NO清除剂cPTIO和抑制剂L-NAME和NaN₃的应用没有缓解低温诱导的氧化胁迫伤害, 因此可以判断SNP于低温胁迫下酸枣幼苗生理指标的回升现象为NO导致的, NO很大部分上是通过减少氧化伤害来提高低温耐性的。

4 结论

冷害胁迫下限制了酸枣种子的萌发和幼苗的发育, 外施NO后能够有效提高酸枣种子的发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数, 且能通过促进幼苗叶片内抗氧化剂AsA和GSH的再生, 降低H₂O₂含量, 抑制膜脂过氧化产物MDA的积累, 提高渗透调节物质Pro含量和APX、MDAR、DHAR、GR等抗氧化酶活性, 来维持酸枣幼苗叶片AsA-GSH循环系统的稳定性, 缓解低温胁迫对酸枣幼苗细胞膜的伤害, 增强酸枣幼苗的抗寒性, 其中以0.5 mmol/L SNP处理的效果最为理想, 且其缓解效应可被NO合成酶抑制剂L-NAME、硝酸还原酶非专一性抑制剂NaN₃及NO清除剂cPTIO所消除。而有关NO如何调控冷害胁迫下酸枣基因转录和表达及其分子机理, 还有待进一步研究。

参考文献 [References]

- 邓荣华, 高瑞如, 刘后鑫, 赵亚锦, 朱广龙, 魏学智. 自然干旱梯度下的酸枣表型变异[J]. 生态学报, 2016, **36** (10): 2954-2961 [Deng RH, Gao RR, Liu HX, Zhu GL, Wei XZ. Phenotypic variation of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* along natural drought gradient [J]. *Acta Ecol Sin*, 2016, **36** (10): 2954-2961]
- Wang DY, Zhao Y, Jiao YD, Yu LH, Yang S, Yang XB. Antioxidative and hepatoprotective effects of the polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. *shaanbeitanzao* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, **88** (4): 1453-1459
- Yusefi TE, Fallah S, Pessarakli M. Effects of seed priming on growth and antioxidant components of hairy vetch (*Vicia villosa*) seedlings under chilling stress [J]. *J Plant Nutr*, 2019 (5): 1-16
- 孙德智, 韩晓日, 彭靖, 范富, 杨恒山, 马玉露, 侯迷红. 外源NO和水杨酸对盐胁迫下番茄幼苗光合机构的保护作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, **24** (3): 457-464 [Sun DZ, Han XR, Peng J, Fan F, Yang H S, Ma YL, Hou MH. Protective effect of exogenous nitric oxide and salicylic acid on the photosynthetic apparatus of tomato seedling leaves under NaCl stress [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (3): 457-464]
- Fan HF, Du CX, Xu YL, Wu X. Exogenous nitric oxide improves chilling tolerance of chinese cabbage seedlings by affecting antioxidant enzymes in leaves [J]. *Hortic Environ Biotechnol*, 2014, **55** (3): 159-165
- Wang DF, Liu HY, Tan XF, Liu HF, Zeng GM, Hu XJ, Jian H, Gu YL. Effect of exogenous nitric oxide on antioxidative system and s-nitrosylation in leaves of *Boehmeria nivea* (L.) gaud under cadmium

- stress [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2015, **22** (5): 3489
- 7 Wang J, Yu SX, Zhang M, Cui XM. Exogenous nitric oxide-mediated GSH-PC synthesis pathway in tomato under copper stress [J]. *Russ J Plant Phys*, 2015, **62** (3): 349-359
 - 8 Caro A, Puntarulo S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function [J]. *Free Radic Res*, 1999, **31** (Sup): 205-212
 - 9 Wang T, Yang WH, Xie YF, Shi DW, Ma YL, Sun X. Effects of exogenous nitric oxide on the photosynthetic characteristics of bamboo (*Indocalamus barbatus* McClure) seedlings under acid rain stress [J]. *Plant Growth Regul*, 2017, **82** (1): 69-78
 - 10 Fan HH, Li TC, Guan L, Li ZP, Guo N, Cai YP, Lin Y. Effects of exogenous nitric oxide on antioxidation and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2012, **109** (2): 307-314
 - 11 周万海, 师尚礼, 寇江涛. 盐胁迫下外源NO对苜蓿幼苗生长及氮代谢的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, **23** (11): 3003-3008 [Zhou WH, Shi SL, Kou JT. Effects of exogenous nitric oxide on the growth and nitrogen metabolism of alfalfa seedlings under salt stress [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2012, **23** (11): 3003-3008]
 - 12 Wang QH, Liang X, Dong YJ, Xu LL, Zhang XW, Kong J, Liu S. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on physiological characteristics of perennial ryegrass under cadmium stress [J]. *J Plant Growth Regul J*, 2013, **32** (4): 721-731
 - 13 Akladios SA, Mohamed H I. Physiological role of exogenous nitric oxide in improving performance, yield and some biochemical aspects of sunflower plant under zinc stress [J]. *Acta Biol Hung*, 2017, **68** (1): 101-114
 - 14 Khoshbakht D, Asghari M R, Haghighi M. Effects of foliar applications of nitric oxide and spermidine on chlorophyll fluorescence, photosynthesis and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings under salinity stress [J]. *Photosynthetica*, 2018, **56** (4): 1313-1325
 - 15 吴锦程, 陈建琴, 梁杰, 杨伟博, 吴晶晶, 陈丽钦, 刘美琼, 陈丽平. 外源一氧化氮对低温胁迫下枇杷叶片AsA-GSH循环的影响[J]. *应用生态学报*, 2009, **20** (6): 1395-1400 [Wu JC, Chen JQ, Liang J, Yang WB, Wu JJ, Chen LQ, Liu MQ, Chen LP. Effects of exogenous NO on ascorbate-glutathione cycle in loquat leaves under low temperature stress [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2009, **20** (6): 1395-1400]
 - 16 Gadelha CG, Miranda RDS, Alencar, Nara LM, Costa, José H, Prisco, José T, Gomes F, Enéas. Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation [J]. *J Plant Physiol*, 2017, **212**: 69-79
 - 17 陈银萍, 王晓梅, 杨宗娟, 于飞, 思显佩. NO对低温胁迫下玉米种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2012, **31** (2): 270-277 [Chen YP, Wang XM, YANG ZJ, Yu F, Si XP. Effects of nitric oxide on seed germination and physiological reaction of maize seedlings under low temperature stress [J]. *J Agro-enviro Sci*, 2012, **31** (2): 270-277]
 - 18 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000 [Zou Q. Experimental Guidance of Plant Physiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000]
 - 19 Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, **22** (5): 867-880
 - 20 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002 [Chen JX, Wang XF. Guide of Plant Physiological Experiments [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2002]
 - 21 Rao KVM, Sresty TV. Antioxidant parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses [J]. *Plant Sci*, 2000, **157**: 113-128
 - 22 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 姜孝成. 种子生物学研究指南[M]. 北京: 科学出版社, 2005 [Song SQ, Cheng HY, Long CL, Jiang XC. Guide of Seed Biology Research [M]. Beijing: Science Press, 2005]
 - 23 Zhang XQ, Wang KC, Zhang YN, Wang Q, Cui ZW. Effects of exogenous nitric oxide on physiology of seed germination and seedling growth of *Silybum marianum* under NaCl stress [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, **44** (22): 3216-3222
 - 24 Li WQ, Liu XM, Khan M A, Yamaguchi S. The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline conditions [J]. *J Plant Res*, 2005, **118** (3): 207-214
 - 25 Hu KD, Hu LY, Li YH, Zhang FQ, Zhang H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress [J]. *Plant Growth Regul*, 2007, **53** (3): 173-183
 - 26 Liu HY, Yu X, Cui DY, Sun MH, Sun WN, Tang ZC, Kwak SS, Su WA. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination [J]. *Cell Res*, 2007, **17** (7): 638-649
 - 27 Jhanji S, Setia RC, Kaur N, Kaur P, Setia N. Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of *Brassica napus* L[J]. *J Environ Biol*, 2012, **33** (6): 1027-1032.
 - 28 于秀针, 张彩虹, 姜鲁艳, 吐尔逊娜依·热依木江, 马艳, 马彩雯. 外源NO对低温胁迫下番茄种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *北方园艺*, 2014 (22): 5-8 [YU XZ, Zhang CH, Jiang LY, Tuerxun-nayi-RYMJ, Ma Y, Ma CW. Effects of exogenous nitric oxide on tomato seed germination and growth of tomato seedling [J]. *North Horticul*, 2014 (22): 5-8]
 - 29 樊怀福, 杜长霞, 朱祝军. 外源NO对低温胁迫下黄瓜幼苗生长、叶片膜脂过氧化和光合作用的影响[J]. *浙江农业学报*, 2011, **23** (3): 538-54 [Fan HF, Du CX, Zhu ZJ. Effects of exogenous nitric oxide on plant growth, membrane lipid peroxidation and photosynthesis in cucumber seedling leaves under low temperature [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2011, **23** (3): 538-54]
 - 30 相昆, 徐颖, 李国田, 王晓芳, 张美勇. 外源NO对低温胁迫下核桃幼苗活性氧代谢的影响[J]. *林业科学*, 2016, **52** (1): 143-149 [Xiang K, Xu Y, Li GT, Wang XF, Zhang MY. Effects of exogenous nitric oxide on reactive oxygen metabolism of walnut seedlings under low temperature stress [J]. *Sci Silv Sin*, 2016, **52** (1): 143-149]
 - 31 李彩霞, 林碧英, 申宝营, 刘旭, 刘亚男, 廖自月. 低温对茄子幼苗生理特性的影响及耐冷性指标的筛选[J]. *福建农业学报*, 2018, **33** (9): 930-936 [Li CX, Lin BY, Shen BY, Liu X, Liu YN, Liao ZY. Effects of low temperature on physiological properties of eggplant seedlings and selection of cold tolerance indicators [J]. *J Fujian Agric Sci*, 2018, **33** (9):

- 930-936
- 32 陈润娟, 雷娅伟, 白小明, 田彦锋. 外源NO对野生早熟禾幼苗抗寒性的影响[J]. 中国沙漠, 2017, **37** (6): 1171-1179 [Chen RJ, Lei YW, Bai XM, Tian YF. Effect of NO on cold resistance of several wild kentucky bluegrass germplasm materials [J]. *J Des Res*, 2017, **37** (6): 1171-1179]
 - 33 Allenr RD, Webb RP, Schake SA. Use of transgenic plantsto study antioxidant defenses [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, **23** (3): 473-479
 - 34 吴锦程, 陈伟建, 蔡丽琴, 谢翠萍, 黄世杰, 林良津, 叶美兰. 外源NO对低温胁迫下枇杷幼果抗氧化能力的影响[J]. 林业科学, 2010, **46** (9): 73-78 [Wu JC, Chen WJ, Cai LQ, Xie CP, Huang SJ, Lin LJ, Ye ML. Effects of exogenous nitric oxide on antioxidant capacity of young fruits under low temperature stress [J]. *Sci Silv Sin*, 2010, **46** (9): 73-78]
 - 35 Tian QY, Sun DH, Zhao MG, Zhang WH. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos* [J]. *New Phytol*, 2007, **174** (2): 322-331
 - 36 Shapiro AD. Nitric oxide signaling in plants [J]. *Vitan Horm*, 2005, **72** (72): 339-398
 - 37 Xiang C, Oliver DJ. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, **10** (9): 1539-1550
 - 38 Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice [J]. *Plant Sci*, 2002, **163** (3): 515-523
 - 39 杨美森, 王雅芳, 干秀霞, 罗宏海, 张亚黎, 张旺锋. 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 [Yang MS, Wang YF, Gan XX, Luo HH, Zhang YL, Zhang WF. Effects of exogenous nitric oxide on growth, antioxidant system and photosynthetic characteristics in seedling of cotton cultivar under chilling injury stress [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, **45** (15): 3058-3067]
 - 40 黄志明, 吴锦程, 陈伟健, 蔡丽琴, 谢翠萍, 林良津, 黄世杰, 叶美兰. SA对低温胁迫后枇杷幼果AsA-GSH循环酶系统的影响[J]. 林业科学, 2011, **47** (9): 36-42 [Huang ZM, Wu JC, Chen WJ, Cai LQ, Xie CP, Lin LJ, Huang SJ, Ye ML. Effects of SA on enzymes of ascorbate-glutathione cycle in young loquat fruits after low temperature stress [J]. *Sci Silv Sin*, 2011, **47** (9): 36-42]
 - 41 Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* [J]. *Physiol Plantarum*, 2010, **110** (1): 42-51