

外源一氧化氮提高一年生黑麦草抗冷性机制

马向丽¹, 魏小红^{2*}, 龙瑞军^{1,3}, 崔文娟², 万引琳²

(1. 甘肃农业大学草业学院, 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学生命科学学院, 兰州 730070; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008)

摘要:用不同浓度的一氧化氮(NO)供体硝普纳(sodium nitroprusside, SNP)处理低温胁迫下 1 年生黑麦草幼苗, 探讨外源 NO 对提高黑麦草幼苗抗冷性的作用。结果表明: 外源 NO 能减缓低温胁迫下黑麦草幼苗质膜相对透性的增加, 促进脯氨酸(Pro)的积累, 提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)保护酶活性, 其中 POD 酶活性的提高尤为显著。恢复生长时, 经 SNP 处理的幼苗膜透性、脯氨酸和保护酶活性恢复较快, 其中 0.5 mmol/L SNP 处理的效果最为明显, 0.2、1.0 mmol/L SNP 处理的效果次之。

关键词:1 年生黑麦草; 一氧化氮(NO); 低温胁迫; 保护酶; 抗冷性

文章编号:1000-0933(2005)06-1269-06 **中图分类号:**Q948 **文献标识码:**A

Studies on mechanism of enhancing the chilling resistance of annual ryegrass by exogenous nitric oxide

MA Xiang-Li¹, WEI Xiao-Hong^{2*}, LONG Rui-Jun^{1,3}, CUI Wen-Juan², WAN Yin-Lin² (1. Faculty of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. School of Life Science & Technology of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810008, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6): 1269~1274.

Abstract: The annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) was used in this study. The seeds of ryegrass were germinated in a growth chamber at 20±1 °C, with 60% to 80% of humidity, under 12h light (400 lx)/12h dark. The continuous illumination was provided by cool-white fluorescent lamps (400 lx). When the second or the fourth leaves fully expanded the normal leaves were selected for the experiments.

SNP ([Na₂Fe(CN)₅] · NO, Merck, Karmstadt, Germany) was used as NO donor. In the experiments the stock solution of 10mmol/L SNP was prepared and immediately diluted to the demanded concentrations. The following two experiments were carried out:

Experiment 1 The SNP spraying treatment; in the growth chamber, when the first leaves fully expanded (3~4cm long) the seedlings were grouped and sprayed with solution of SNP at different concentrations of 0, 0.2, 0.5 and 1.0mmol/L, which contained 2‰ Polysorbate-80 to increase the leaf surface tension. The spray treatments were conducted once a day for three consecutive days. Then the samples with triplicate were taken up for the further determination.

Experiment 2 Chilling stress; As soon as the Experiment 1 was finished, some of ryegrass leaves were kept in growth chamber at 0 °C to suffer from chilling stress. Therefore the treatments were designed as follows: A Normal control; B 0 °C-chilling stress control; C 0.2mmol/L SNP + 0 °C-chilling stress; D 0.5mmol/L SNP + 0 °C-chilling stress and E 1.0mmol/L SNP + 0 °C-chilling stress. The above chilling stress treatments lasted for one or three days in the growth chamber. Then the

基金项目:甘肃省教育厅基金资助项目(032B-01); 教育部高校优秀青年教师教学科研奖励基金资助项目; 中国科学院“百人计划”资助项目

收稿日期:2004-07-13; **修订日期:**2004-12-26

作者简介:马向丽(1980~), 女, 湖北襄樊人, 硕士生, 主要从事草业生态生理研究。E-mail: xfmaksiangli@126.com

* **通讯作者** Author for correspondence. E-mail: weixiaohong2005@sina.com

Foundation item: Natural Science Foundation of Education Department of Gansu Province (No. 032B-01), and the Teaching and Research Award Program for Outstanding Young Teacher in Higher Education Institutions of MOE, P. R. C.; the “100 Talents Program” of Chinese Academy of Science

Received date: 2004-07-13; **Accepted date:** 2004-12-26

Biography: MA Xiang-Li, Master candidate, mainly engaged in ecology and physiology of grassland. E-mail: xfmaksiangli@126.com

growth chamber was reset at 20 °C, thereby getting the ryegrass back to a normal growth for three days. During chilling stress period and after a 3-day recovering growth, the leaves were sampled with triplicate.

All the samples obtained from the above two experiments were used to measure the membrane permeability, proline content and the activities of SOD, POD and CAT. All the experimental data were expressed as means \pm SE, and then analyzed by using EXCEL and DPS tools. Moreover the data from independent samples were comprised by using t-test. The different measurements were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA). In all cases the confidence coefficient was set at 0.05 and 0.01.

The results showed that the SNP treatment was able to alleviate the rise of membrane permeability and accelerate the accumulation of proline in ryegrass under chilling stress. Moreover, the activities reduction trends of SOD, POD and CAT in the treated seedlings were apparently slowed compared to those of chilling stress controlled seedlings. After a 3-day recovery, the membrane permeability, proline content and protective enzymes activities of the seedlings treated with SNP got back to the levels of normal seedlings, while those of chilling stress seedlings were not able to get recovery completely due to the chilling damage. These indicated that the SNP had a function of protecting seedlings from being harmed by chilling stress; in particular, the effect of 0.5 mmol/L SNP was much significant. The mechanism that NO is able to enhance cold resistance of ryegrass might be related to the modulation of the activities of protective enzymes and the variation of the membrane permeability and the proline content.

Key words: annual ryegrass; nitric oxide(NO); chilling stress; protective enzymes; cold resistance

草坪草同其它植物一样,常遭受不良环境的影响。温度是影响草坪草生长及分布的重要生态因子之一。草坪草的生长温度域很窄,冷季型草的适宜温度为 15.6~23.9 °C,超过此限,草坪草的正常生长发育和健康就会受到影响^[1]。在温度胁迫下草坪草将发生一系列生理反应,其中细胞保护酶活性、膜透性、脯氨酸含量等生理参数可作为评价草坪草抗冷性强弱的指标^[2~4]。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)是植物细胞内清除活性氧的重要保护酶,在胁迫强度和胁迫时间不超过植物活性氧调控限度时,保护酶可诱导植物避免活性氧自由基对植物的伤害^[5]。植物遭受低温冷害时,膜脂发生相变,膜透性增加,溶质向胞外渗透,代谢失调,导致植物的代谢和死亡^[6],所以,细胞质膜相对透性可反映低温下植物细胞膜受伤害的程度^[7]。脯氨酸为细胞渗透调节物质,植物体内脯氨酸的含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,其含量的多少与植物抗性呈正相关^[8]。用生理生化方法来提高草坪草的抗冷性,对于提高草坪质量,解决冬季草坪泛黄现象,延长绿期有着重要的意义。

一氧化氮(NO)作为广泛分布于生物体的一类气体生物活性分子,属于活性氮(reactive nitrogen species, RNS)范畴。植物体内通过酶促和非酶促途径产生 NO^[9~11]。大量研究表明,自由基,尤其是活性氧自由基与植物的抗性密切相关^[12]。NO 可能以自由基的形式参与植物抗逆生理生化过程^[13],也可能是通过提高胞内其它活性氧诱发抗性反应^[14]。Beligni 等^[15]在研究 NO 对马铃薯叶片保绿的实验中发现,NO 具有中和植物细胞中活性氧自由基的作用。

此外,Caro 和 Puntarulo^[16]观察到 NO 还可以显著降低大豆胚轴微粒体超氧阴离子的释放速度,说明 NO 在植物细胞中具有氧化与抗氧化双重作用。低浓度 NO 可以促进植物的生长发育^[17~19],也可以缓解盐胁迫诱导的小麦叶片膜脂过氧化,提高耐盐性^[20]。Garcia Mata 和 Lamattina^[21]研究发现外源 NO 预处理可以提高干旱胁迫下田间植物叶片的保水性、降低离子渗透、诱导气孔关闭,从而提高耐旱性。2004 年,王宪叶等^[22]首次发现外源 NO 预处理对小麦渗透胁迫造成的膜质过氧化有明显的缓解作用。作为信号分子,NO 在植物抗逆性中的作用越来越受重视。但是,NO 对提高草坪草抗冷性的研究尚未见报道。本研究选用特高(Tetragold)1 年生四倍体多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)为供试材料,通过叶片喷施外源 NO,研究 NO 对低温胁迫下 1 年生黑麦草膜透性及保护酶活性的影响,探讨 NO 对提高草坪草抗冷性的作用。

1 材料与方法

(1)材料与处理 供试草种为特高 1 年生四倍体多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)。将黑麦草种子均匀播撒于预先装入高压蒸汽灭菌处理的土壤花盆中,置于 20 \pm 1 °C 的培养箱中生长,每天光照 12h,黑暗 12h,光强为 4000lx。待生长至 2~3 叶期,选取长势整齐一致,无病,无损伤的植株进行 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理。3 个 SNP 处理浓度分别为 0.2、0.5 和 1.0 mmol/L,各浓度处理量为 100ml,采用喷雾器喷施于黑麦草叶面,每个处理 3 次重复,对照处理为蒸馏水。喷施后用塑料薄膜覆盖植株保湿 2h。连续喷施 3d,每天 1 次,第 4 天将经过 SNP 处理的植物材料从培养箱中取出,在 0 °C 进行低温胁迫 1~3d。3d 后取出置光照培养箱中在 20 °C 常温下恢复生长。试验分 5 种处理:A. 常温对照(20 °C);B. 低温对照(0 °C);C. 0.2 mmol/L SNP 喷施加低温处理(0 °C);D. 0.5 mmol/L SNP 喷施加低温处理(0 °C);E. 1.0mmol/L SNP 喷施加低温处理(0 °C)。各处理取生长一致的幼苗于冷胁迫前(0d)、冷胁迫期间(1d、2d、3d)及恢复生长第 3 天取样测定有关生理生化指标。

(2)测定方法 参照王韵唐主编的《植物生理学实验指导》^[23],质膜相对透性的测定采用 DDS-11A 电导仪法,以相对电导率表示;脯氨酸的测定采用茚三酮显色法;过氧化氢酶(CAT)的测定采用碘滴定法;过氧化物酶(POD)的测定采用愈伤姆酚氧化法;超氧化物歧化酶(SOD)的测定采用 NBT 显色法。每项指标的测定重复 3 次。

(3)数据处理 数据通过 Microsoft Excel 和 DPS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 外源 NO 对低温胁迫下黑麦草细胞膜透性的影响

由图 1 可见,低温胁迫前 SNP 处理组质膜相对透性显著低于对照组($p<0.05$),胁迫期间膜透性随时间的延长而增加,但 SNP 处理苗增加幅度较低温对照苗的缓慢。在低温胁迫第 1 天,低温对照苗的质膜相对透性较常温对照苗增加了 42.2%,而 0.2、0.5 和 1.0mmol/L SNP 处理苗增加分别为常温对照苗的 31.3%、22.6%和 23.4%,均显著低于低温对照苗($p<0.05$)。胁迫第 3 天时各处理质膜相对透性的增加均达到最大,低温对照苗增加最为显著,达到 61.4%;而各 SNP 处理幼苗质膜相对透性的增加第 3 天较第 2 天都有不同程度的减缓。

2.2 外源 NO 供体对低温胁迫下黑麦草脯氨酸含量的影响

如图 2 所示,低温胁迫条件下出现脯氨酸累积,随胁迫时间的延长,黑麦草叶片内脯氨酸累积逐渐增加,第 3 天时低温对照苗的脯氨酸含量比常温对照苗提高了 62.4%,且较低温胁迫第 1 天增加了 48.8%。SNP 处理组低温胁迫前脯氨酸含量高于对照组($p<0.05$),胁迫第 1 天时脯氨酸含量也开始增加,至第 3 天达到最高,SNP 0.2 mmol/L 处理的黑麦草幼苗叶片的脯氨酸含量比常温对照苗增加了 97.9%,SNP 0.5 mmol/L 增加了 150.6%,1.0 mmol/L SNP 增加了 76.3%,其中以 SNP 0.5mmol/L 差异最显著($p<0.05$)。由此可见外源 NO 可以促进低温胁迫下黑麦草脯氨酸含量的增加。

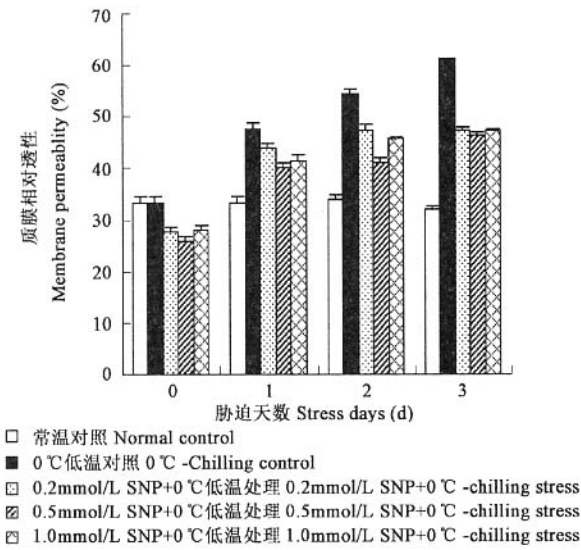


图 1 NO 对低温胁迫下黑麦草膜透性的影响(±SE)
Fig. 1 Effect of nitric oxide on the membrane permeability in ryegrass under chilling stress(±SE)

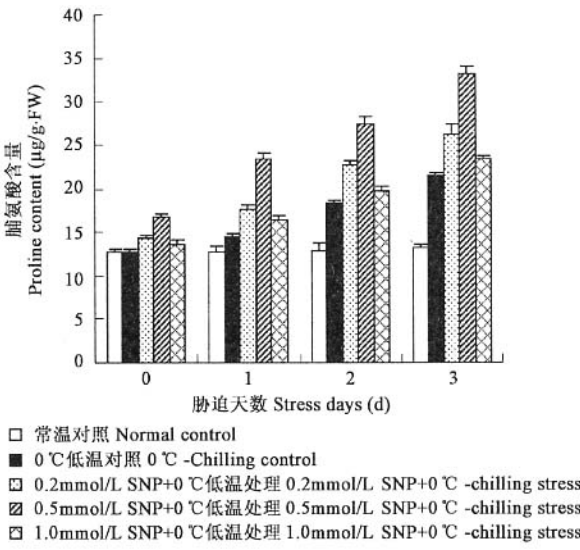


图 2 NO 对低温胁迫下黑麦草脯氨酸含量的影响(±SE)
Fig. 2 Effect of nitric oxide on proline content in ryegrass under chilling stress(±SE)

2.3 外源 NO 对低温胁迫下黑麦草 SOD、CAT 和 POD 酶活性的影响

由图 3 可见,在持续 3d 的低温胁迫中,随着胁迫时间的延长,SOD、CAT 和 POD 3 种酶活性的变化趋势有所不同。外源 NO 处理可显著提高 SOD 酶活性。低温胁迫前 SNP 处理组 SOD 酶活性要显著高于对照组。在低温胁迫期间,低温对照苗 SOD 酶活性随胁迫天数的增加呈线性降低,趋势方程为 $y = -0.0889x + 13.057$ 。而 SNP 处理组的幼苗在胁迫的第 1~第 2 天活性有所上升,第 3 天则迅速下降。在第 2 天时各 SNP 处理苗(0.2、0.5、1.0 mmol/L)SOD 酶活性(U/min · gFW)达到最大,分别为 28.5、37.6 和 29.1,而此时的低温对照苗以降至 10.1,差异极显著($p<0.01$)。第 3 天时 SNP 处理组 SOD 酶活性也开始下降,表明至第 3 天,胁迫强度和胁迫时间已超过黑麦草活性氧调控的限度,外源 NO 的保护作用渐至丧失。图 4 显示,外源 NO 处理也可延缓低温胁迫下 CAT 酶活性下降的程度。未进行低温胁迫时 SNP 处理组 CAT 酶活性要显著高于对照组。低温胁迫期间,低温对照苗 CAT 酶活性随胁迫天数的增加持续下降,外源 NO 处理组的幼苗与之变化趋势相似,但下降程度较轻。在低温胁迫第 3 天各处理的 CAT 酶活性均下降至最低点,低温对照苗下降为胁迫第 1 天的 75%,0.2、0.5 和 1.0 mmol/L SNP 处理苗分别降至胁迫第 1 天为 35%、45%和 46%,差异显著($p<0.05$)。如图 5 所示,POD 酶活性在低温胁迫期间的变化不同于

SOD 和 CAT 酶。外源 NO 处理的黑麦草幼苗在 3d 的低温胁迫期间 POD 酶活性一直呈上升趋势,在胁迫的第 1、2 天 POD 酶活性增加显著,第 3 天趋势变缓;0.2mmol/L SNP 处理的幼苗在胁迫第 3 天时 POD 活性较常温对照苗增加 66.6%,0.5 和 1.0 mmol/L SNP 处理的幼苗分别增加了 99.9%,幼苗较常温对照苗增加了 79.9%,POD 活性的提高达到显著水平 ($p < 0.05$);而低温对照苗在第 1、2 天有缓慢增加,第 3 天显著下降 ($p < 0.05$),较常温对照苗下降了 38%。表明外源 NO 可显著地诱导 POD 酶活性的提高。

2.4 恢复生长第 3 天黑麦草叶片内各物质含量及保护酶活性的变化

表 1 结果显示,常温生长 3d 后,经低温胁迫的植株其膜透性、脯氨酸含量及保护酶系的活性均有不同程度的恢复。恢复生长后,低温对照苗的细胞膜透性、脯氨酸含量逐渐恢复接近常温对照苗,但 SOD, CAT 和 POD 酶活性均低于常温对照苗 ($p < 0.05$)。SNP 处理的幼苗细胞膜透性显著低于常温对照苗,脯氨酸含量显著高于常温对照苗 ($p < 0.05$),其中 SNP 0.5mmol/L 处理的苗差异最为明显 ($p < 0.05$)。恢复生长后 SNP 处理组 CAT 酶活性均高于对照 ($p < 0.05$)。SNP 0.5mmol/L 处理的黑麦草 SOD 恢复到接近常温对照苗的水平 ($p > 0.05$),而 SNP 0.2 mmol/L 和 SNP 1.0 mmol/L 处理的黑麦草叶片未能恢复到常温对照苗的水平 ($p < 0.05$)。

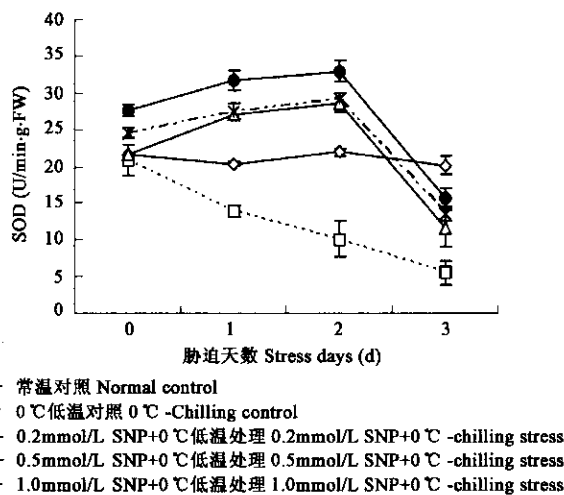


图 3 NO 对低温胁迫下黑麦草 SOD 活性的影响 (\pm SE)

Fig. 3 Effect of nitric oxide on SOD activity in ryegrass under chilling stress (\pm SE)

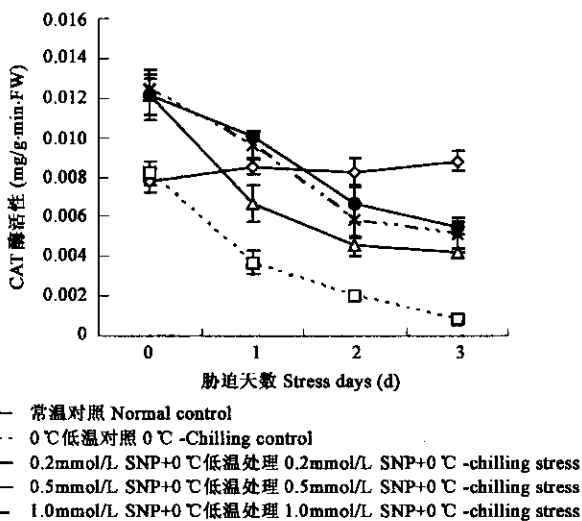


图 4 NO 对低温胁迫下黑麦草 CAT 活性的影响 (\pm SE)

Fig. 4 Effect of nitric oxide on CAT activity in ryegrass under chilling stress (\pm SE)

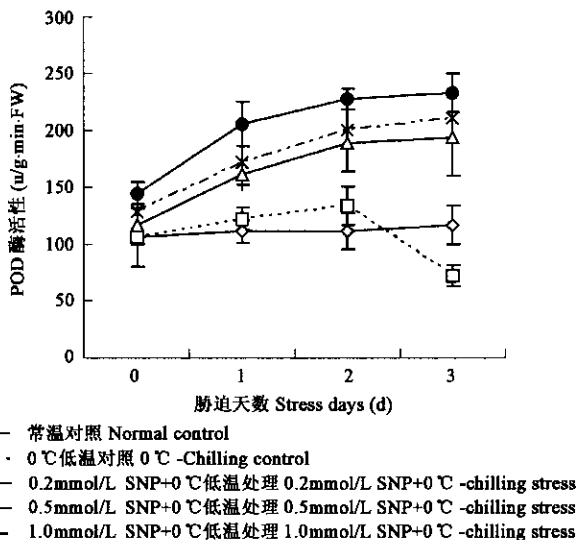


图 5 NO 对低温胁迫下黑麦草 POD 活性的影响 (\pm SE)

Fig. 5 Effect of nitric oxide on POD activity in ryegrass under chilling stress (\pm SE)

3 讨论

植物细胞膜对维持细胞的微环境和正常代谢起着重要作用。正常条件下,细胞膜对物质具有选择透性的能力。当植物受到逆境影响时,如低温伤害,细胞质膜的透性会发生不同程度的增大,导致细胞膜结构功能的破坏,细胞内溶质大量外渗^[24]。膜透性增大的程度与逆境胁迫强度有关,也取决于植物抗逆性的强弱^[25]。本试验结果表明:外源 NO 处理降低了低温胁迫下黑麦草细胞膜的质膜相对透性。说明外源 NO 对细胞膜具有良好的保护或修复作用,可减轻或防止细胞膜系统的伤害。这可能是外源 NO 缓和了膜相变化,从而缓解了膜透性增大和离子外漏。其中 0.5 mmol/L 的 SNP 处理对细胞膜保护作用最为显著。

逆境条件下(旱、盐碱、热、冷、冻),植物体内的脯氨酸含量显著增加,一定程度上反映了植物的抗逆性。本试验结果表明:外源 NO 处理的幼苗在低温胁迫下其脯氨酸含量增加明显高于对照,脯氨酸能维持细胞的结构和调节渗透压,使植物具有一定抗

性。本试验结果较好地反映了外源 NO 可缓解低温对黑麦草幼苗造成的伤害。

表 1 恢复生长第 3 天黑麦草叶片内质膜相对透性、脯氨酸含量及各种保护酶活性的变化(±SE)

Table 1 Changes of Leakage of electrolyes, proline content and the activities of protective enzymes in the ryegrass after growth resumes for 3 days(±SE)

项目 Index	质膜相对透性 Membrane permeability(%)	脯氨酸含量 Proline content (umol/gFW)	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (U/(min · gFW))	过氧化氢酶 Catalase (mg/(min · gFW))	过氧化物酶 Peroxidase (umol/(min · gFW))
A	32.1±0.18	13.1±0.38	20.2±1.59	0.009±0.0007	122.2±9.62
B	33.5±0.53*	14.5±0.29	14.8±0.26*	0.005±0.0008*	94.4±19.2
C	28.5±0.50*	16.1±0.45*	17.3±0.55*	0.006±0.0007*	216.7±33.3*
D	24.6±0.64	18.4±0.35*	19.5±0.79	0.008±0.0005	250.0±16.7*
E	26.9±0.44*	15.8±0.27*	18.5±0.51*	0.007±0.0005*	227.8±25.5*

A 常温对照 Normal control; B 0℃低温对照 0℃-chilling stress control; C 0.2mmol/L SNP + 0℃低温处理 0.2mmol/L SNP + 0℃-chilling stress; D 0.5mmol/L SNP + 0℃低温处理 0.5mmol/L SNP + 0℃-chilling stress; E 1.0mmol/L SNP + 0℃低温处理 1.0mmol/L SNP + 0℃-chilling stress; * 常温对照差异显著($p<0.05$)

许多研究表明, NO 可以通过调节植物体内的活性氧(reactive oxygen species,ROS)代谢来减轻胁迫伤害。例如外源 NO 供体(SNP)可以通过提高小麦叶片的抗氧化能力来缓解盐胁迫条件下的氧化损伤^[20]。另一方面,NO 可以诱导植物叶片保卫细胞的气孔关闭,来降低干旱胁迫下的蒸腾作用,并可能与 ABA 水平的调节有关^[26]。另外,NO 抑制植物线粒体活性的同时也可增强抗氰呼吸,避免因线粒体电子传递链受阻而导致 ROS 的积累^[27]。逆境条件下,植物细胞产生的 OH⁻、O₂⁻ 和 H₂O₂ 等自由基增多,自由基启动膜脂过氧化作用导致膜的损伤和破坏,造成植物体内重要的活性氧清除酶 SOD、CAT 和 POD 等膜保护酶活性降低。因此,提高逆境下植物体内的 SOD、CAT 和 POD 酶活性能减缓膜脂过氧化过程^[28,29]。本试验结果表明,外源 NO 处理可以提高低温胁迫下黑麦草幼苗 SOD、CAT 和 POD 的活性,并能维持在较高的水平上,尤其能显著诱导 POD 活性的增高。但外源 NO 对 3 种保护酶的诱导效果并不一致,可能与 NO 在信号传导中的位置有关,也可能与植物低温胁迫下 SOD、CAT 和 POD 在膜脂过氧化中产生的位置和调节机制的不同有关。幼苗恢复常温生长以后,外源 NO 浸种处理的幼苗细胞膜透性和膜保护酶活性恢复较低温对照之幼苗快。说明外源 NO 处理的黑麦草幼苗,受低温胁迫损伤较轻,细胞膜的修复较快,其中以 SNP0.5mmol/L 处理的幼苗效果显著。

研究表明,外源 NO 缓解膜脂过氧化、提高保护酶系活性,主要在于,一方面 NO 通过抑制顺乌头酸酶等含非血红素铁类酶活性来参与植物抗性生理反应。植物胞质顺乌头酸酶同工酶被 NO 氧化失活后,可能转变为铁调节蛋白(iron-regulatory peotein,IRP),进而调节体内铁稳态来影响与植物抗性有关的·OH 生成^[30]。另一方面,NO 还可能影响过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascrobate peroxidase,APX)和细胞色素 C 氧化酶(cytochrome c oxidase,COX)^[31]等含血红素铁的酶活性来参与植物体内的生理代谢。从本试验结果来看,外源 NO 提高 1 年生黑麦草抗冷性与其抑制幼苗细胞质膜相对透性升高,促进脯氨酸积累及提高 SOD, CAT 和 POD 等保护酶的活性有关。

References:

[1] Wang D J, Wen Y. Study on cold resistance of several kinds of cold-season turfgrass under temperature stress. *Acta Prataculture Sinica*, 1989, **1**(1):75~80.

[2] Ren S P, Wang J J, Yu Z X. Researches on stress resistance of 8 kinds of turfgrass. *Wuhan Botany Research*, 1995, **13**(1): 78~80.

[3] Du F. Changes of several resistance physiological indexes of perennial ryegrass and meadow bluegrass under chilling stress. *Sichuan Grassland*, 1998, (4):41~48.

[4] He Y L, Shen J. Studies on heat resistance mechanism-changes of chlorophyl content and POD activity in *Poa pratens* L. under heat stress. *Pratacultural Science*, 1997, **15**(12):128~132.

[5] You M G, Mao K, *et al.* Turfgrass and temperature. *Grassland and Turf.*, 2003, **5**(1): 15~18.

[6] Zhang F S. *Chilling stress and plant rhizosphere nutrition*. Beijing: Chinese Agricultural Press,1998. 148~173.

[7] Zhang Y, Fang L, *et al.* Effects of PEG on membrane lipid peroxidation in tobacco seedlings under chilling stress. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, **23**(6): 549~552.

[8] You J H, Lu J M, Yang W J. Studies on cold resistance and effects on related physiological index by Ca in clove seedling. *Pratacultural Science*, 2003, **12** (1):31~33.

[9] Chandok M R, Ytterberg A J, van Wijk K J, *et al.* The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase comples. *Cell*, 2003, **113**(4):1380~1384.

[10] Shen W B. Nitrate reductase is also a nitric oxide-synthesis enzyme in plants. *Plant Physiol Commun.*, 2003, **39**(2):168~170.

[11] Shen W B. New function of nitrate reductase: synthesizing NO. *Chemistry of Life*, 2000, **20**(5):243.

- [12] Levine A, Tenhaken R, Dixon R A, *et al.* H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response as a local trigger of programmed cell death and a diffusible inducer of cellular protectant genes. *Cell*, 1994, **79**:583~593.
- [13] Dong H L, Jing J X. Role of reactive oxygen and NO in resistance to plant diseases. *Jour. of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For. (Nat. Sci. Ed.)*, 2003, **31**(1):161~166.
- [14] Clark D, Durner J, Navarre DA. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol. Plant-Microbe. Interact.*, 2000, **13**(12): 1380~1384.
- [15] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta*, 1999, **208**:337~344.
- [16] Caro A, Puntarulo S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic. Res.*, 1999, **31**(Sup): 205~212.
- [17] Beligni M V, Lamattina L. Is nitric oxide toxic or protective. *Trends Plant Sci.*, 1999, **4**(8):299~300.
- [18] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongatin, three light inducible responses in plants. *Planta*, 2000, **210**:215~221.
- [19] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.*, 2001, **6**(11):508~509.
- [20] Ruan H H, Shen W B, Ye M B, *et al.* Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat leaves. *Chin. Sci. Bull.*, 2001, **46**(23):1993~1997.
- [21] Garcia-Mata C, Lamattina L. Nitric oxide induces improved assays and an assay applicable to acrylamidegels. *Anal. Biochem.*, 2001, **44**(2):276~287.
- [22] Wang X Y, Shen W B, Xu L L. Exogenous nitric oxide alleviates osmotic stress-induced membrane lipid peroxidation in wheatseedling leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, **30**(2):195~200.
- [23] Wang S T ed. *Plant physiological experimental guide*. Xi'an:Shanxi Science & Technology Press, 1986.
- [24] Lin H X. Plant cold damage and cell physiology. Xiamen:Xiamen Press, 1994. 131~132.
- [25] Zhang Y, Fang L, *et al.* Effects of PEG on membrane lipid peroxidation in tobacco seedlings under chilling stress. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, **23**(6): 549~552.
- [26] Mata C G, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.*, 2001, **126**: 1196~1204.
- [27] Delledone M, Xia Y, Dixon RA, *et al.* Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998, **394**:585~588.
- [28] Gao X Y, Fang L, Xu Z Q, *et al.* Effects of Ca²⁺ on protective enzymes of membrane lipid peroxidation in soybean under water stress. *Journal of South China Agricultural University*, 1990, (2):7~12.
- [29] Kellogg E W, Fridovich I. Hydrogen peroxide, and single oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase system. *Biochem.*, 1975, **250**: 8812~8817.
- [30] Naverre D A, Wendehenne D, Durner J, *et al.* Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.*, 2000, **122**: 573~582.
- [31] Stamler J S, Singel D J, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated form. *Science*, 1992, **258**: 1898~1901.

参考文献:

- [1] 王代军, 温洋. 温度胁迫下几种冷季型草坪草抗性机制的研究. *草业学报*, 1989, **1**(1):75~80.
- [2] 任世平, 王君健, 于志照. 8 种草坪草的抗逆性研究. *武汉植物学研究*, 1995, **13**(1):78~80.
- [3] 杜峰. 低温胁迫下草坪草 Perennial ryegrass 和 Meadow bluegrass 各抗性生理指标的变化. *四川草原*, 1998, (4):41~48.
- [4] 何亚丽, 沈剑. 冷地形草坪草耐热机理初探. 草地早熟禾在热境胁迫下叶绿素含量和 POD 酶活性的变化. *草业科学*, 1997, **15**(12):128~132.
- [5] 游明鸿, 毛凯, 等. 草坪植物与温度. *草原与草坪*, 2003, **5**(1):15~18.
- [6] 张福锁. 低温胁迫与植物根际营养. 北京:中国农业出版社, 1998. 148~173.
- [7] 张燕, 方力, 等. 低温胁迫下 PEG 对烟草幼苗膜脂过氧化作用的影响. *西南农业大学学报*, 2001, **23**(6):549~552.
- [8] 由继红, 陆静梅, 杨文杰. 钙对苜蓿幼苗抗寒性及相关生理指标影响的研究. *草业学报*, 2003, **12**(1):31~33.
- [10] 沈文飏. 硝酸还原酶也是植物体内 NO 合成酶. *植物生理学通讯*, 2003, **39**(2):168~170.
- [11] 沈文飏. 植物硝酸还原酶的新功能:合成 NO. *生命的化学*. 2000, **20**(5):243.
- [20] 阮海华, 沈文飏, 等. 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应. *科学通报*, 2001, **46**(23):1993~1997.
- [22] 王宪叶, 沈文飏, 徐朗莱. 外源 NO 对渗透胁迫下小麦幼苗叶片膜脂过氧化的缓解作用. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, **30**(2):195~200.
- [23] 王韶唐主编. *植物生理学实验指导*. 西安:陕西科学技术出版社, 1986.
- [24] 林海馨. *植物冷害与细胞生理*. 厦门出版社, 1994. 131~132.
- [25] 张燕, 方力, 等. PEG 和低温胁迫对烟草幼苗某些生理特性的影响. *吉林农业大学学报*, 2002, **24**(6):14~19.
- [26] 高向阳, 杨根平, 许志强, 等. 水分胁迫下钙对大豆膜质过氧化保护酶系统的影响. *华南农业大学学报*, 1990, (2):7~12.