

低温处理对北美冬青叶片抗氧化能力的影响

陈茜^{a,b}, 周之涵^{a,c*}, 王瑞琪^{a,c}, 王雅雅^{a,c}, 彭佩文^{a,c}, 陈颖^{a,b**}

(南京林业大学, a. 南方现代林业协同创新中心; b. 生物与环境学院; c. 林学院; 南京 210037)

摘要: 为了解低温对北美冬青(*Ilex verticillata*)生长的影响, 对 2 年生扦插苗经低温处理(-6℃)后的生长和抗氧化能力进行了研究。结果表明, 随着低温处理时间的延长, 北美冬青叶片的叶绿素/类胡萝卜素比值和叶绿素 b 含量增加, 而其他色素含量都呈下降趋势; 相对电导率(REC)和 H₂O₂ 含量(72 h 除外)显著增加。低温处理对超氧化物歧化酶(SOD)活性影响不大, 却显著降低 CAT 的活性。低温处理过氧化物酶(POD)活性显著提高, 48 h 活性达到最高; 而抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性在处理 12 h 达最高, 然后下降。还原型抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量均呈先升高再下降的趋势。因此, 北美冬青在短时间内(≤24 h)能够忍受低温(-6℃), 抗氧化防御系统在低温初期起关键的作用, 但随时间延长(72 h)其抗氧化能力减弱。

关键词: 北美冬青; 低温; 抗氧化系统

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.06.013

Effect of Low Temperature Stress on Antioxidant Ability in *Ilex verticillata* Leaves

CHEN Xi^{a,b}, ZHOU Zhi-han^{a,c*}, WANG Rui-qi^{a,c}, WANG Ya-ya^{a,c}, PENG Pei-wen^{a,c}, CHEN Ying^{a,b**}

(a. Collaborative Innovation Center of the Southern Modern Forestry; b. College of Biology and Environment; c. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to understand the effect of low temperature on growth of *Ilex verticillata*, the photosynthetic pigment contents, antioxidant enzymes activities and antioxidant ability of 2-year-old seedlings under -6℃ were studied. The results showed that the chlorophyll, carotenoids contents in leaves decreased, while the ratio of chlorophyll/carotenoids and chlorophyll b content increased under low temperature. The REC (relative electrical conductivity) and H₂O₂ content significantly increased under low temperature. There was no significant difference in superoxide dismutase (SOD) activity, but the catalase (CAT) activity significantly reduced. Under low temperature, the peroxidase (POD) activity significantly increased, and reached the peak treated for 48 h. The ascorbate peroxidase (APX) activity enhanced treated for 12 h, and then decreased. The AsA (ascorbic acid) and GSH (glutathione) contents increased at first 24 h then decreased from 48 to 72 h. Therefore, *Ilex verticillata* seedlings could endure low temperature stress for short term (12-24 h), and antioxidant system could play key role in cold stress at early stage, but it might suffer damage with time extension under low temperature.

收稿日期: 2016-03-15 接受日期: 2016-06-07

基金项目: 国家林业局 948 引进先进技术项目(2014-4-61); 江苏省高校优势学科建设工程项目; 南京林业大学大学生创新训练计划项目(2015sjcx021)资助

This work was supported by the 948 Project of State Bureau of Forestry of China (Grant No. 2014-4-61), the Program for Priority Academic Program Development of Jiangsu Province (PAPD), and the Project for College Students Innovative Entrepreneurial Training in Nanjing Forestry University (Grant No. 2015sjcx021).

作者简介: 陈茜(1992~), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物逆境生理与生物技术。E-mail: 948092138@qq.com

* 并列第一作者

** 通信作者 Corresponding author. E-mail: chynjfu@163.com

Key words: *Ilex verticillata*; Low temperature; Antioxidant system

低温是限制植物自然分布和栽培区带的主要因素之一,也是我国的自然灾害之一^[1-2]。低温影响植物的生长发育、生理生化代谢及光合作用,低温胁迫下茶树(*Camellia sinensis*)叶片的 PS II 最大光化学效率(Fv/Fm)降低^[3];广玉兰(*Magnolia grandiflora*)幼苗在低温下叶片变黄,叶绿素含量降低,净光合速率下降^[4];低温胁迫导致玉米(*Zea mays*)幼苗 H₂O₂ 含量显著升高^[5]。但低温胁迫下植物自身也会通过增加细胞内的相关抗寒物质和提高酶活性来抵御冷害^[6-7],甘蔗(*Saccharum officinarum*)幼苗在低温下超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性提高^[8]。另外,低温还能提高过氧化氢酶(CAT)、SOD、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等基因的表达,进而提高酶的活性^[9-10]。低温下抗坏血酸(AsA)-谷胱甘肽(GSH)循环在清除活性氧(Reactive oxygen species, ROS)过程中发挥着极其重要的作用^[11]。因此,研究低温胁迫对植物的伤害作用及其机理、探索植物抗冷冻机制及其预防措施,对于植物引种栽培具有重要的指导意义。

北美冬青(*Ilex verticillata*)又名轮生冬青、美洲冬青、落叶冬青,是引自北美洲东部的冬青科(Aquifoliaceae)冬青属落叶灌木,树形优美,结果量大、鲜红玲珑、挂果期可延迟到次年的二月,是极具观赏和商业价值的园林树种^[12-13]。北美冬青在欧美等国家得到广泛的应用,而在我国引种的时间并不长,仅在江、浙、鲁等地区引进了一些品种,大面积推广种植还没有展开。目前有关北美冬青的研究主要集中在组织培养快速繁殖、扦插生根等方面,而对其低温下的适应性研究尚未见报道。

为了扩大北美冬青的北移种植,研究北美冬青的耐寒适应性非常重要,另外我国北方春季有倒春寒的现象,急剧降温下北美冬青的适应性如何,这些都是北美冬青引种时必须关注的问题。本文研究低温处理对北美冬青生长和抗氧化能力的影响,探讨其对低温的适应机制,同时为北美冬青的引种栽培提供理论依据和技术指导。

1 材料和方法

1.1 材料

以北美冬青(*Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’) 2 年

生扦插苗为试验材料,2014 年 10 月将高约 30 cm 的扦插苗移植于 15 cm×10 cm×12 cm 的花盆中,基质为营养土:蛭石:珍珠岩=2:1:1,每盆种植 1 株,置于南京林业大学实验基地温室中培养,温室内温度(25±2)℃,光照强度 160 μmol m⁻²s⁻¹,培养 4 个月,待苗高约 50 cm 后进行低温处理试验。

剪取长势一致、健壮、无病虫害的北美冬青枝条(10 cm),切口涂石蜡,用保鲜袋包裹,置于-6℃冰箱中分别进行 12、24、48、72 h 低温处理,试验设置 3 个重复,每个处理 16 根枝条,以不处理(即 0 h)为对照。处理结束后拿出枝条,在 25℃室温缓解 3 h,取枝条顶端往下数第 3~6 片的叶进行生理生化指标测定,一部分叶片用于叶绿素和电导率测定,剩余叶片放入-80℃冰箱保存,用于 H₂O₂ 含量、抗氧化酶活性及抗氧化物质含量的测定。

1.2 生理指标测定

H₂O₂ 含量的测定采用硫酸钛法^[14],相对电导率(REC)、叶绿素(Chl)、类胡萝卜素含量的测定参考 Chen 等的方法^[15]。

称取 0.2 g 叶片放入预冷的研钵中,加入 6 mL 磷酸缓冲液(PBS),充分研磨,于 4℃下 10000×g 离心 20 min,上清液即抗氧化酶提取液。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性测定均参考 Chen 等的方法^[15]。抗坏血酸过氧化物酶(APX)参照 Nakano 等的方法^[16],3 mL 的反应体系中包含 100 mmol L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 6.8),6 mmol L⁻¹ 抗坏血酸(AsA),60 mmol L⁻¹ H₂O₂ 和 0.2 mL 酶提取液,在 290 nm 波长下测定,以 1 min 内 OD 值减少 0.1 为 1 个酶活性单位(U)。还原型抗坏血酸(AsA)含量测定参照 Ueda 等的方法^[17];还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定参照 Ma 等的方法^[18]略有改动,4.5 mL 反应体系中含酶提取液 0.2 mL,100 mmol L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.0),3 mmol L⁻¹ DTNB [5,5 二硫代双(2-硝基苯甲酸)],摇匀后于 30℃水浴锅中保温 5 min,于 412 nm 波长下测定 OD 值,以 GSH 为标样制作标准曲线。

1.3 数据处理

采用 Excel 2007 对数据进行处理,采用软件 SPSS 19.0 进行数据的显著性分析,以 $P<0.01$ 表示

差异极显著。

2 结果和分析

2.1 对叶片光合色素含量的影响

随着低温处理时间的延长, 北美冬青叶片的叶绿素 a (Chl a)、总叶绿素(Chl)及类胡萝卜素(Car)含量、叶绿素 a/叶绿素 b (Chl a/Chl b)比值等 4 个指标都呈下降趋势(图 1)。低温处理 12 h 的 Chl a、Chl 与对照没有显著差异, 但处理 24~72 h 时, 这两个指标出现显著下降, 而 Car 含量、Chl a/Chl b 在整个处理期间均极显著下降($P<0.01$)。处理 72 h 的 Chl a、Chl、Car 含量、Chl a/Chl b 分别比对照下降 43.0%、

25.4%、74.5%、64.6% (图 1: A, C~E)。但北美冬青叶片的 Chl b 含量和总叶绿素/类胡萝卜素(Chl/Car)比值随处理时间的延长呈上升趋势, 处理与对照间差异显著, 但处理间没有显著差异($P>0.01$), 处理 72 h 的 Chl b 含量最高, 比对照提高 76.7%, 处理 72 h 的 Chl/Car 比对照提高 196.6% (图 1: B, F)。

2.2 对叶片相对电导率、 H_2O_2 含量的影响

随着低温处理时间的延长, 北美冬青叶片的相对电导率(REC)呈上升趋势, 处理 48 h 和 72 h 的相对电导率分别比对照提高 68.4%和 82.4% ($P<0.01$, 图 2: A)。过氧化氢(H_2O_2)含量的变化与 REC 的相似, 但 H_2O_2 含量显著增加发生在低温处理 48 h 后, 处

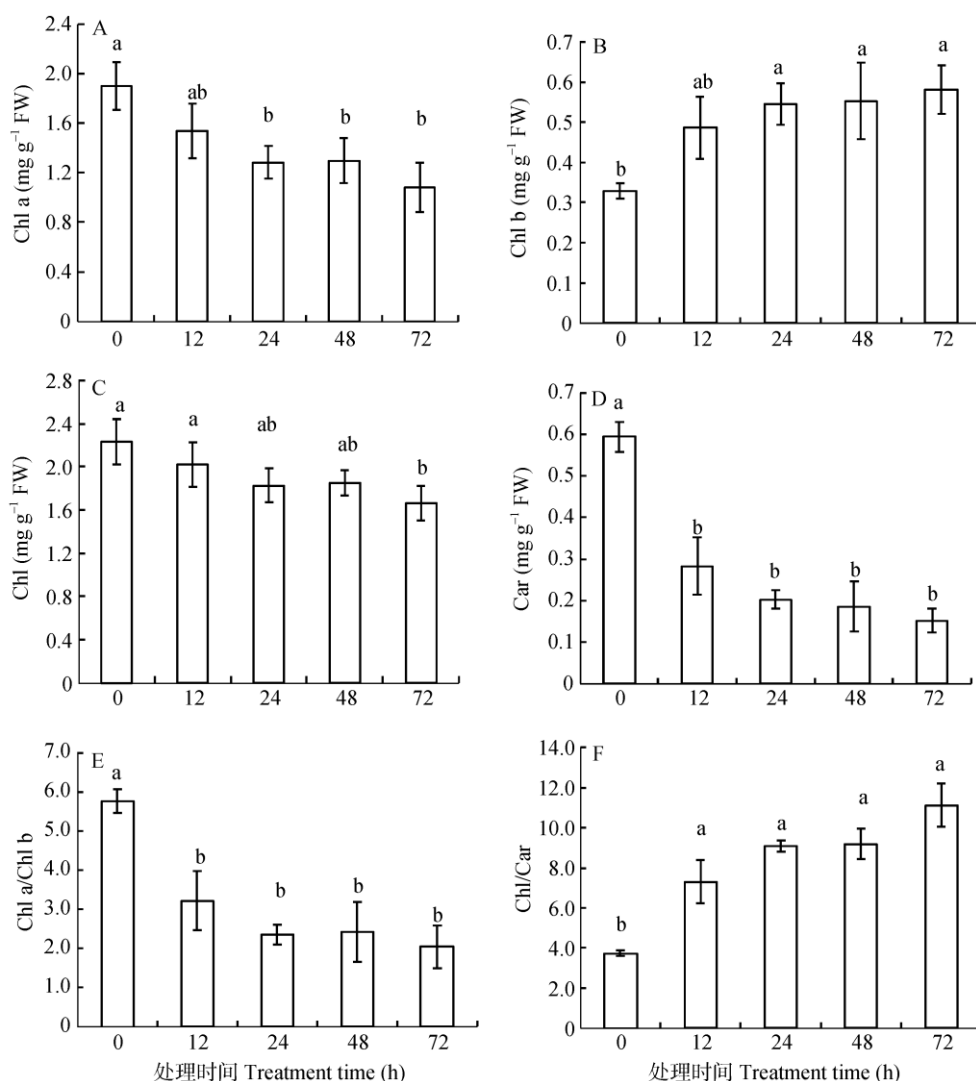


图 1 低温处理对北美冬青叶片光合色素含量的影响。柱上不同字母表示差异极显著($P<0.01$) (邓肯新复极差检验)。下图同。

Fig. 1 Effect of low temperature on photosynthetic pigments in *Ilex verticillata* leaves. Different letters upon column indicate significant difference at 0.01 level. The same is following Figures.

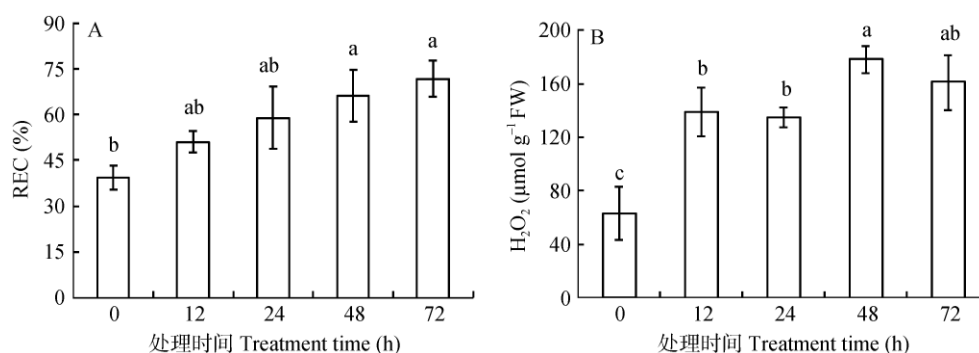


图 2 低温对北美冬青叶片相对电导率(REC)、 H_2O_2 含量的影响

Fig. 2 Effect of low temperature on relative electric conductivity (REC) and H_2O_2 content in *Ilex verticillata* leaves

理 72 h 又有所下降, 处理 48 h 的 H_2O_2 含量比对照增加 181.8% ($P<0.01$, 图 2: B)。

2.3 对叶片抗氧化酶活性的影响

低温处理显著影响北美冬青叶片的抗氧化酶活性。随低温处理时间的延长, 北美冬青叶片 SOD 活性变化不明显, 处理 24~72 h 仅稍有下降, 且没有显著差异($P>0.01$, 图 3: A); 而 POD 活性呈先升高后下降的趋势, 处理 48 h 达到最高, 比对照提高

28.1% ($P<0.01$, 图 3: B), 处理 72 h 又下降。与 POD 不同, 低温处理后 CAT 活性不断降低, 处理与对照存在极显著差异($P<0.01$), 但处理间没有显著差异($P>0.01$), 处理 12 h、24 h、48 h 和 72 h 的 CAT 活性分别比对照降低 51.6%、42.9%、52.7%和 41.9% (图 3: C)。低温处理 12 h 的叶片 APX 活性升高, 随后呈下降的趋势, 处理 12 h 的 APX 活性比对照升高 31.4%, 处理 72 h 的活性最低, 比对照下降 50.2% ($P<0.01$, 图 3: D)。

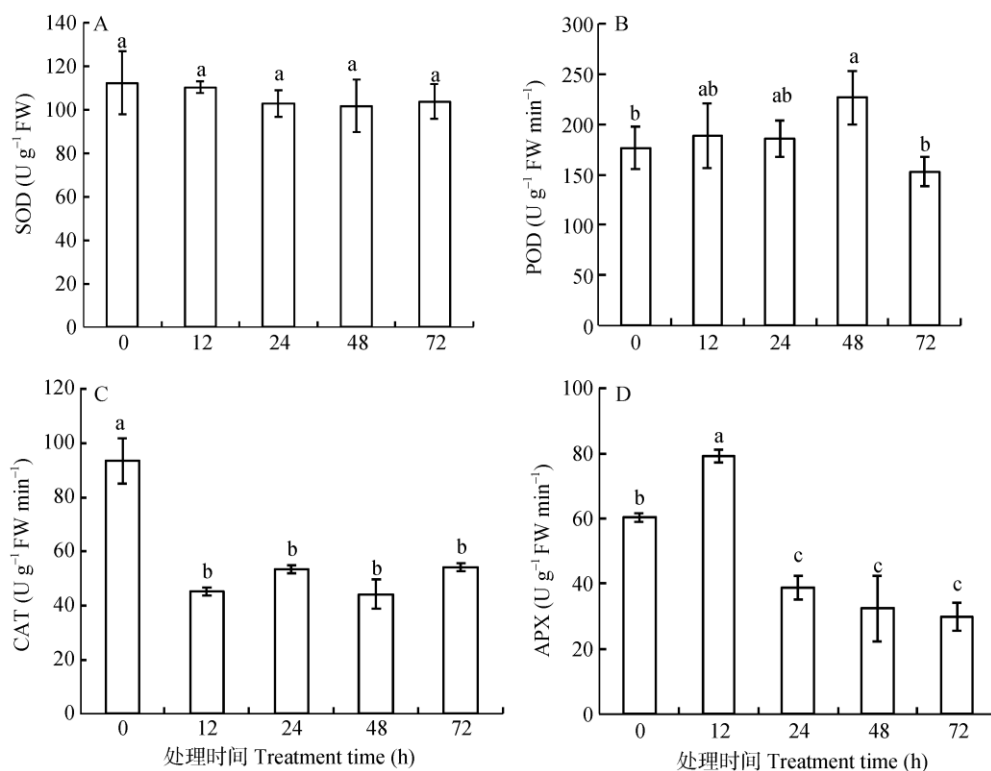


图 3 低温对北美冬青叶中 SOD、POD、CAT、APX 活性的影响

Fig. 3 Effect of low temperature on SOD, POD, CAT and APX activities in *Ilex verticillata* leaves

2.4 对叶片抗氧化剂含量的影响

低温处理对抗氧化物质 AsA、GSH 含量也有较大影响。北美冬青叶片的 AsA 含量呈先升高后降低的趋势, 处理 12 h 和 24 h 的 AsA 含量分别比对照

升高 34.1%和 42.8%, 而处理 72 h 的 AsA 含量比对照下降 60.1% ($P<0.01$, 图 4: A)。GSH 含量在处理 24 h 最高, 比对照增加 55.2%, 而处理 72 h 的比对照下降 39.6% ($P<0.01$, 图 4: B)。

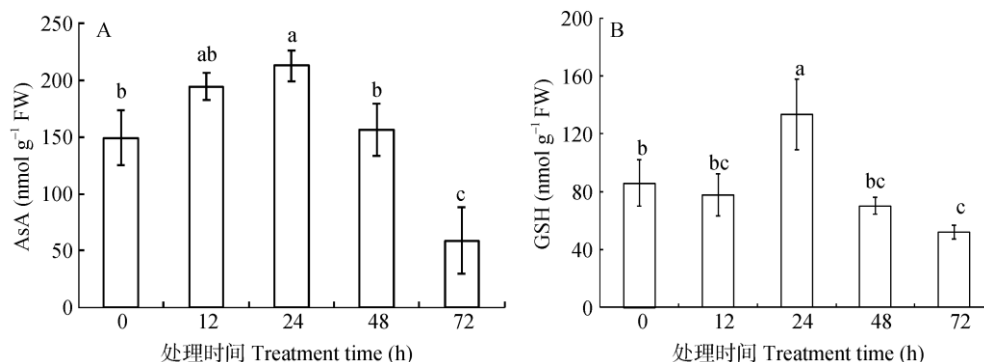


图4 低温对北美冬青叶片中 AsA、GSH 含量的影响

Fig. 4 Effect of low temperature on AsA, GSH contents in *Ilex verticillata* leaves

3 讨论和结论

叶绿体是对逆境胁迫(高温、低温、盐、重金属等)最为敏感的细胞器之一, 低温胁迫在一定程度上抑制叶绿素的形成, 进而影响植物的光合作用^[19]。本研究中, 短时间(12 h)的低温处理对北美冬青叶片叶绿素 a 和总叶绿素含量没有显著变化, 而随低温处理时间的延长(48 h、72 h), 北美冬青叶片的叶绿素 a、总叶绿素、类胡萝卜素含量及叶绿素 a/叶绿素 b 均显著下降, 说明长时间的低温处理(>12 h)会影响叶绿素合成, 这与低温胁迫下广玉兰、杨树苗木叶绿素含量降低的结果相似^[6,20]。但本研究中叶绿素 b 的含量在低温处理期间比对照升高, 高叶绿素 b 含量可增加短波长光的吸收, 有利于植物适应低光强下的环境, 这可能是北美冬青对低温的一种适应。同时, 低温处理下北美冬青的类胡萝卜素含量显著下降, 而且 Chl/Car 也显著提高, 说明低温导致北美冬青类胡萝卜素的降解, 此时北美冬青叶片不是发黄而是出现发红的现象, 推测低温虽导致了北美冬青类胡萝卜素的降解, 但可通过合成花色苷或黄酮类化合物以抵抗低温, 这可能是北美冬青幼苗对低温的一种自我保护机制, 对此还有待进一步验证。

当植物细胞膜受到损伤时, 细胞膜透性会减弱, 细胞内含物易渗漏, 相对电导率(REC)能够间

接反映植物细胞膜的受损情况, H_2O_2 是主要的活性氧(ROS)产物, 其过量积累会造成对细胞的伤害^[20]。本研究结果表明, 短时间(12 h、24 h)低温处理, 北美冬青叶片的 REC 和 H_2O_2 含量缓慢升高, 而随低温处理时间的延长(48 h、72 h), REC 和 H_2O_2 含量则显著增加, 说明长时间低温处理(>24 h)会对北美冬青叶片造成氧化胁迫。

植物体内的抗氧化体系与活性氧积累是一个动态平衡的过程, 抗氧化酶在一定胁迫强度下能够清除活性氧而维持植物的正常生长。许多研究表明, 低温和盐胁迫能提高植物的 SOD 和 CAT 活性, 清除 ROS^[9,21]。本研究结果表明, 低温处理对北美冬青叶片 SOD 活性的影响不明显, 说明低温下 SOD 能够维持一定的活性而保护细胞免受伤害。POD 活性在处理 48 h 显著提高, 有利于活性氧物质的清除, 这与低温胁迫下巨尾桉(*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*)和圆柏(*Sabina chinensis*)的响应相似^[22–23]。CAT 活性在整个处理期均显著降低, 与玉米在低温、水稻在铝和干旱胁迫、甘草(*Glycyrriza uralensis*)在盐和干旱胁迫下 CAT 活性下降的结果一致^[7,24–25], 这可能是因为 CAT 专一性较强, 主要是清除 H_2O_2 , 说明低温处理北美冬青叶片产生的 H_2O_2 含量较高从而抑制该酶的活性。

环境胁迫下植物体内的抗氧化酶和抗氧化物质是一个相互协作的体系。本研究结果表明, 北美

冬青叶片中 H_2O_2 等活性氧的清除还可通过 APX、谷胱甘肽还原酶(GR)及 AsA、GSH 等组成的抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH)途径来完成^[26]。此循环中 APX 与 H_2O_2 结合的亲和力比 POD 和 CAT 的高,对提高 AsA、GSH 与 H_2O_2 发生反应的速度起关键作用^[27]。Nahar 等^[28]对绿豆(*Phaseolus radiatus*)的研究表明,低温胁迫下 APX、GR 活性和 AsA、GSH 含量都显著提高。本研究结果表明,随低温处理时间的延长,APX 活性、AsA 和 GSH 含量均呈先升高后降低的趋势,但 APX 活性在处理 12 h 达到峰值,而 AsA 与 GSH 含量都在处理 24 h 达到高峰,说明短时间(≤ 24 h)的低温处理,北美冬青能够通过提高 AsA-GSH 系统中的酶活性和抗氧化物含量来清除叶绿体中过多的 H_2O_2 ,减少伤害,抵抗低温胁迫。

综上所述,在低温处理初期,北美冬青叶片通过增强保护酶活性(POD、APX)和提高抗氧化物质的含量(AsA、GSH)来清除产生的 H_2O_2 ,减轻低温对细胞的伤害,但随处理时间的延长(72 h),细胞受损加大。抗氧化系统在冷害初期对减轻氧化损伤起着至关重要的作用。

参考文献

- [1] CAO H M, SHI Z M, ZHOU X B, et al. A review on response of plant to low temperature and its cold resistance [J]. Chin J Agrometeor, 2010, 31(2): 310–314. doi: 10.3969/j.issn.1000-6362.2010.02.027.
曹慧明, 史作民, 周晓波, 等. 植物对低温环境的响应及其抗寒性研究综述 [J]. 中国农业气象, 2010, 31(2): 310–314. doi: 10.3969/j.issn.1000-6362.2010.02.027.
- [2] ZHU X C, SONG F B, XU H W. Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis [J]. Plant Soil, 2010, 331(1/2): 129–137. doi: 10.1007/s11104-009-0239-z.
- [3] LI Q H, XU H, ZHOU L, et al. Effect of low temperature stress on chlorophyll fluorescence characteristics in leaf of two cultivars of *Camellia sinensis* [J]. J Plant Resour Environ, 2015, 24(2): 26–31. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.02.04.
李庆会, 徐辉, 周琳, 等. 低温胁迫对 2 个茶树品种叶片叶绿素荧光特性的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2015, 24(2): 26–31. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.02.04.
- [4] ZHOU J, YANG L F, HAO F G, et al. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence of *Magnolia grandiflora* seedlings under low temperature stress [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin, 2009, 29(1): 136–142. doi: 10.3321/j.issn.1000-4025.2009.01.021.
周建, 杨立峰, 郝峰鸽, 等. 低温胁迫对广玉兰幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(1): 136–142. doi: 10.3321/j.issn.1000-4025.2009.01.021.
- [5] XU T J, DONG Z Q, LAN H L, et al. Effects of PASP-KT-NAA on photosynthesis and antioxidant enzyme activities of maize seedlings under low temperature stress [J]. Acta Agron Sin, 2012, 38(2): 352–359. doi: 10.3724/SP.J.1006.2012.00352.
徐田军, 董志强, 兰宏亮, 等. 低温胁迫下聚糠茶合剂对玉米幼苗光合作用和抗氧化酶活性的影响 [J]. 作物学报, 2012, 38(2): 352–359. doi: 10.3724/SP.J.1006.2012.00352.
- [6] DIE J V, ROWLAND L J. Elucidating cold acclimation pathway in blueberry by transcriptome profiling [J]. Environ Exp Bot, 2014, 106: 87–98. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.12.017.
- [7] SALAZAR-GUTIERREZ M R, CHAVES B, HOOGENBOOM G. Freezing tolerance of apple flower buds [J]. Sci Hort, 2016, 198: 344–351. doi: 10.1016/j.scienta.2015.12.003.
- [8] SUN F, YANG L T, XIE X N, et al. Effect of chilling stress on physiological metabolism in chloroplasts of seedlings of sugarcane varieties with different chilling resistance [J]. Acta Agron Sin, 2012, 38(4): 732–739. doi: 10.3724/SP.J.1006.2012.00732.
孙富, 杨丽涛, 谢晓娜, 等. 低温胁迫对不同抗寒性甘蔗品种幼苗叶绿体生理代谢的影响 [J]. 作物学报, 2012, 38(4): 732–739. doi: 10.3724/SP.J.1006.2012.00732.
- [9] WU F Z, WANG H X, XU G H, et al. Research progress on the physiological and molecular mechanisms of woody plants under low temperature stress [J]. Sci Silv Sin, 2015, 51(7): 116–128. doi: 10.11707/j.1001-7488.20150713.
乌凤章, 王贺新, 徐国辉, 等. 木本植物低温胁迫生理及分子机制研究进展 [J]. 林业科学, 2015, 51(7): 116–128. doi: 10.11707/j.1001-7488.20150713.
- [10] MATSUMURA T, TABAYASHI N, KAMAGATA Y, et al. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress [J]. Physiol Plant, 2002, 116(3): 317–327. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160306.x.
- [11] LUO Y, TANG H R, ZHANG Y. Effect of low temperature stress on activities of SOD and enzymes of ascorbate-glutathione cycle [J]. Acta Hort Sin, 2007, 34(6): 1405–1410. doi: 10.3321/j.issn:0513-353x.2007.06.010.
罗娅, 汤浩茹, 张勇. 低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响 [J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1405–1410. doi: 10.3321/j.issn:0513-353x.2007.06.010.
- [12] ZHANG J L, YU Y X, SHEN B C, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’ [J]. Plant Physiol J, 2014,

- 50(10): 1541–1545.
- 张俊林, 余有祥, 沈柏春, 等. 北美冬青‘奥斯特’的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(10): 1541–1545.
- [13] YU Y X, ZHA L, XU M Y, et al. A softwood propagation technique of *Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’ [J]. China For Sci Techn, 2015, 29(1): 27–29. doi: 10.13360/j.issn.1000–8101.2015.01.008.
- 余有祥, 查琳, 徐旻昱, 等. ‘奥斯特’北美冬青嫩枝扦插技术 [J]. 林业科技开发, 2015, 29(1): 27–29. doi: 10.13360/j.issn.1000–8101.2015.01.008.
- [14] ZHANG X L, WANG P C, SONG C P. Methods of detecting hydrogen peroxide in plant cells [J]. Chin Bull Bot, 2009, 44(1): 103–106. doi: 10.3969/j.issn.1674–3466.2009.01.012.
- 张小莉, 王鹏程, 宋纯鹏. 植物细胞过氧化氢的测定方法 [J]. 植物学报, 2009, 44(1): 103–106. doi: 10.3969/j.issn.1674–3466.2009.01.012.
- [15] CHEN Y, LUO Y Y, QIU N F, et al. Ce^{3+} induces flavonoids accumulation by regulation of pigments, ions, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes in suspension cells of *Ginkgo biloba* L. [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2015, 123(2): 283–296. doi: 10.1007/s11240-015-0831-2.
- [16] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiol, 1981, 22(5): 867–880.
- [17] UEDA Y, WU L B, FREI M. A critical comparison of two high-throughput ascorbate analyses methods for plant samples [J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 70: 418–423. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.06.006.
- [18] MA X Q, ZHANG J, HUANG B R. Cytokinin-mitigation of salt-induced leaf senescence in *Perennial ryegrass* involving the activation of antioxidant systems and ionic balance [J]. Environ Exp Bot, 2016, 125: 1–11. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.01.002.
- [19] QUEIRÓS F, FIDALGO F, SANTOS I, et al. *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. [J]. Biol Plant, 2007, 51(4): 728–734. doi: 10.1007/s10535-007-0149-y.
- [20] JIANG X B, SONG Y P, MA K F, et al. Changes of several physiological indices in hybrid clones of *Populus deltoides* Bartr. × *P. ussuriensis* Kom. under low temperature stress [J]. J Beijing For Univ, 2012, 34(1): 58–63.
- 江锡兵, 宋跃朋, 马开峰, 等. 低温胁迫下美洲黑杨与大青杨杂种无性系若干生理指标变化研究 [J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(1): 58–63.
- [21] FILIPPOU P, BOUCHAGIER P, SKOTTI E, et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity [J]. Environ Exp Bot, 2014, 97: 1–10. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.09.010.
- [22] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48(12): 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- [23] LÜ C Q, HUANG B L. Effects of boron on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems in leaves of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* under low temperature [J]. J Trop Subtrop Bot, 2003, 11(3): 217–222. doi: 10.3969/j.issn.1005–3395.2003.03.004.
- 吕成群, 黄宝灵. 低温下硼对巨尾桉枝叶膜脂过氧化及体内保护系统的影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(3): 217–222. doi: 10.3969/j.issn.1005–3395.2003.03.004.
- [24] YU F, CHEN Y P, YANG Z J, et al. Effects of low temperature stress on antioxidant enzymes activities in the subcellular of two *Sabina* species [J]. Guihaia, 2014, 34(5): 686–69. doi: 10.3969/j.issn.1000–3142.2014.05.019.
- 于飞, 陈银萍, 杨宗娟, 等. 低温胁迫对两种圆柏属植物亚细胞抗氧化酶活性的影响 [J]. 广西植物, 2014, 34(5): 686–693. doi: 10.3969/j.issn.1000–3142.2014.05.019.
- [25] SHARMA P, DUBEY R S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: Role of osmolytes as enzyme protectant [J]. J Plant Physiol, 2005, 162(8): 854–864. doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.011.
- [26] PAN Y, WU L J, YU Z L. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) [J]. Plant Growth Regul, 2006, 49(2/3): 157–165. doi: 10.1007/s10725-006-9101-y.
- [27] ZUSHI K, MATSUZOE N, KITANO M. Developmental and tissue-specific changes in oxidative parameters and antioxidant systems in tomato fruits grown under salt stress [J]. Sci Hort, 2009, 122(3): 362–368. doi: 10.1016/j.scienta.2009.06.001.
- [28] NAHAR K, HASANUZZAMAN M, ALAM M M, et al. Exogenous spermidine alleviates low temperature injury in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings by modulating ascorbate-glutathione and glyoxalase pathway [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 30117–30132. doi: 10.3390/ijms161226220.