

# 低温逆境对不同核桃品种抗氧化系统及超微结构的影响\*

田景花<sup>1</sup> 王红霞<sup>2</sup> 张志华<sup>2\*\*</sup> 高 仪<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; <sup>2</sup>河北农业大学山区研究所, 河北保定 071001)

**摘 要** 为揭示核桃抗寒机理, 确定核桃抗寒性鉴定适宜的生化指标, 以展叶期抗寒性不同的哈特雷、晋龙1号和晋龙2号3个品种1年生枝条的叶片为材料, 测定了1℃低温下抗氧化酶活性及超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )含量的变化, 并采用透射电子显微镜观察低温逆境对抗寒性差异大的哈特雷和晋龙2号叶肉细胞超微结构的影响。结果表明: 低温胁迫前后抗寒性强的哈特雷叶片中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性最高, 超氧阴离子含量最低, 叶肉细胞超微结构较稳定, 叶片没有明显冷害症状。抗寒性差的晋龙2号随着低温胁迫时间的延长, 3种抗氧化酶活性的下降幅度最大,  $O_2^{\cdot-}$ 含量始终处于高水平; 胁迫72 h时细胞叶绿体普遍膨胀, 基粒片层变薄, 数目减少, 部分叶绿体被膜及质膜清晰度下降, 部分顶端小叶叶缘呈水浸状, 表现出冷害症状。可见, 低温逆境下核桃叶肉细胞超微结构的稳定性与其品种的抗寒性密切相关。SOD、POD活性以及 $O_2^{\cdot-}$ 含量可作为展叶期核桃抗寒性鉴定的生化指标; 低温胁迫下核桃叶片细胞内膜系统的损伤与活性氧积累之间可能存在一定的相互关系。

**关键词** 核桃; 低温逆境; 抗氧化酶; 超氧阴离子; 超微结构

**文章编号** 1001-9332(2015)05-1320-07 **中图分类号** S664.1 **文献标识码** A

**Effects of chilling stress on antioxidant system and ultrastructure of walnut cultivars.** TIAN Jing-hua<sup>1</sup>, WANG Hong-xia<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-hua<sup>2</sup>, GAO Yi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China; <sup>2</sup>Mountainous Areas Research Institute, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2015, **26** (5): 1320–1326.

**Abstract:** In order to reveal cold hardiness mechanisms and ascertain suitable cold hardiness biochemical indicators of walnut (*Juglans regia*), three walnut cultivars ‘Hartley’, ‘Jinlong 1’ and ‘Jinlong 2’ with strong to weak tolerance of chilling stress, were used to investigate variations of leaf antioxidant enzyme activity and superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) content in one year-old branches under chilling stress at 1℃ in leaf-expansion period. The mesophyll cells ultrastructure of ‘Hartley’ and ‘Jinlong 2’ under chilling stress were also observed by transmission electron microscope. The results showed that the superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) enzyme activities were the strongest and  $O_2^{\cdot-}$  content was the lowest in chilling-tolerant cultivar ‘Hartley’ under chilling stress among the three cultivars. The ultrastructure of the mesophyll cells was stable, and chilling injury symptoms of the leaves were not observed. In chilling-sensitive cultivar ‘Jinlong 2’, the SOD, POD and catalase enzyme (CAT) activities decreased sharply, and the  $O_2^{\cdot-}$  content was kept at a high level under chilling stress. The ultrastructure of the mesophyll cells was injured obviously at 1℃ for 72 hours. Most of chloroplasts were swollen, and grana lamella became thinner and fewer. A number of chloroplasts envelope and plasma membrane were damaged and became indistinct. At the same time, the edges of some of ‘Jinlong 2’ young leaves became water-soaked. It was concluded that the ultrastructure stability of mesophyll cells under chilling stress was closely related to

\* 河北省自然科学基金项目(C2010000773)资助。

\*\* 通讯作者。E-mail: zzh@hebau.edu.cn

2014-07-31 收稿, 2015-03-05 接受。

walnut cold hardiness. SOD, POD enzyme activities and  $O_2^{\cdot-}$  content in walnut leaves could be used as biochemical indicators of walnut cold hardiness in leaf-expansion period. There might be a correlation between the damage of cell membrane system and reactive oxygen accumulation under chilling stress.

**Key words:** walnut; chilling stress; antioxidant enzyme; superoxide anion; ultrastructure.

核桃 (*Juglans regia*) 属于喜温树种, 春季萌动后抗寒能力迅速下降<sup>[1]</sup>. 近年来, 由于晚霜引起的核桃花芽、嫩梢、花器官和幼果等寒害时有发生, 严重影响了产量<sup>[2]</sup>, 选用抗寒品种是防止核桃寒害最根本和有效的措施. 目前, 有关休眠期及展叶期不同核桃品种的抗寒性差异已有报道<sup>[3-4]</sup>, 但有关核桃抗寒机理方面的研究较少.

植物的抗氧化系统与其低温伤害密切相关<sup>[5-7]</sup>, 有关低温逆境下不同抗寒性核桃品种叶片中抗氧化系统的活性变化缺乏研究. 对蓝莓<sup>[8]</sup>、咖啡<sup>[9]</sup>、苜蓿<sup>[10]</sup>等植物的研究表明, 抗寒性强的品种抗氧化酶活性往往高于抗寒性弱的品种, 随胁迫时间延长, 保护酶活性下降, 抗寒性强的品种下降幅度小. 积累起来的活性氧能引发并加剧细胞膜脂过氧化, 从而造成膜系统损伤<sup>[7,10]</sup>. 超氧化物歧化酶 (SOD) 通常被看作是酶防御系统的核心酶, SOD 活性的高低可反映出植物对逆境的抵御能力, 而过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性的变化与低温逆境的相互关系有不同报道<sup>[11-13]</sup>.

研究表明, 低温胁迫下抗寒性强的植物品种细胞超微结构比不抗寒品种更稳定<sup>[14-15]</sup>. 低温逆境对植物最主要的负作用是造成严重的膜损伤<sup>[16]</sup>, 这也是超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 伤害植物的机理之一<sup>[6]</sup>. 本研究以展叶期抗寒性不同的核桃品种为材料, 测定了低温逆境下核桃叶片 SOD、POD 和 CAT 活性以及超氧阴离子含量的变化, 采用透射电子显微镜研究了低温逆境下不同抗寒性核桃品种叶肉细胞的超微结构变化, 以期确定展叶期核桃抗寒力鉴定适宜的生化指标, 为揭示核桃的抗寒机理提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及低温处理

材料采自河北农业大学标本园, 树势中庸, 以展叶期抗寒性差异明显的 3 个核桃品种的一年生枝叶为试验材料, 抗寒性从强到弱依次为哈特雷 (Hartley)、晋龙 1 号、晋龙 2 号. 经电导法测定, 3 个品种展叶期叶片的低温半致死温度分别为  $-7.38$ 、 $-2.17$  和  $-0.40$   $^{\circ}\text{C}$ <sup>[3]</sup>.

在核桃展叶期 (2012 年 4 月 20—23 日) 于每天 6:30 取样 (胁迫 12 h 的为前一天下午取样). 每处理选取 4 个长势一致的 1 年生生长枝, 在智能人工气候箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂) 中水培, 光照强度 4000 lx, 光照时间 12 h,  $5$   $^{\circ}\text{C}$  下预处理 2 h 后缓慢降温至  $1$   $^{\circ}\text{C}$ , 进行低温处理, 分别处理 12、24、48 和 72 h 后取样, 以未经低温处理的材料作为对照. 透射电镜制样选用抗寒性差异大的哈特雷和晋龙 2 号 2 个品种, 低温处理后立即取材; 同时, 采集处理后的枝条中部叶片, 分装于塑料袋中密封, 液氮速冻后存放于  $-70$   $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中, 用于各项生理指标的测定.

### 1.2 抗氧化酶活性及超氧阴离子含量的测定

称取 0.4 g (去主脉) 超低温保存的核桃叶片, 加入预冷的  $0.05$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.8 的磷酸钠盐缓冲液 1 mL, 在冰浴中研磨成匀浆, 加入少量石英砂和 3% 的不溶性吡咯烷酮 (PVP). 用磷酸钠盐缓冲液定容到 5 mL, 于  $4$   $^{\circ}\text{C}$ 、 $10000$   $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 20 min, 上清液即为酶的粗提液, 用于蛋白质、抗氧化酶活性以及超氧阴离子含量的测定.

可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法<sup>[17]</sup>; SOD 活性的测定采用 SOD 抑制氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法, 以抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶活性单位<sup>[17]</sup>; POD 活性的测定采用愈创木酚显色法并略改动<sup>[17]</sup>; CAT 活性的测定采用碘量法<sup>[18]</sup>. 超氧阴离子自由基含量的测定参照王爱国等<sup>[19]</sup>的方法, 采用羟胺定量法.

### 1.3 核桃幼叶细胞超微结构的观察

参照田景花等<sup>[20]</sup>的方法制备超薄切片. 取各处理枝条顶端的幼叶 (直径约 1.5 cm), 用预冷的蒸馏水冲洗干净, 滤纸吸干, 用双面刀片从叶片中部中脉两侧切取  $0.5$   $\text{mm} \times 1.0$   $\text{mm}$  大小的组织块. 所用器具用前要预冷, 取样过程在冰浴上进行, 将切好的组织块迅速投入 3% 戊二醛固定液中, 真空泵抽气 15 min, 待大部分叶块下沉后, 于  $4$   $^{\circ}\text{C}$  下固定 4 h; 洗涤后再用 1% 锇酸于  $4$   $^{\circ}\text{C}$  下后固定 3 h. 漂洗后常规系列乙醇脱水, 丙酮过渡, 环氧树脂 Spon812 渗透并包埋. 于 37、45 和 60  $^{\circ}\text{C}$  下分别聚合 12、12 和 24 h. 采用 LKB-8800 型超薄切片机切片, 2% 醋酸双氧铀 25  $^{\circ}\text{C}$

下染色 30 min,在 JEM-100SX 型透射电子显微镜下观察、拍照.

1.4 数据处理

采用 Excel 2003 软件对数据进行统计分析并作图;采用 DPS 7.05 软件进行相关性分析.透射电子显微镜底片经扫描后用 ACDSee 6.0 软件处理.

2 结果与分析

2.1 低温逆境下一年生枝叶的冷害症状

各品种的一年生枝叶在低温处理 48 h 前,均没有明显的冷害症状;胁迫到 72 h 时,抗寒性差的晋龙 2 号枝条的部分顶端小叶的叶缘开始呈现水浸状,之后变干,而哈特雷和晋龙 1 号无明显的冷害症状.

2.2 低温逆境下不同核桃品种叶片 SOD、POD 和 CAT 活性的变化

由图1可以看出,低温处理前,3个品种叶片

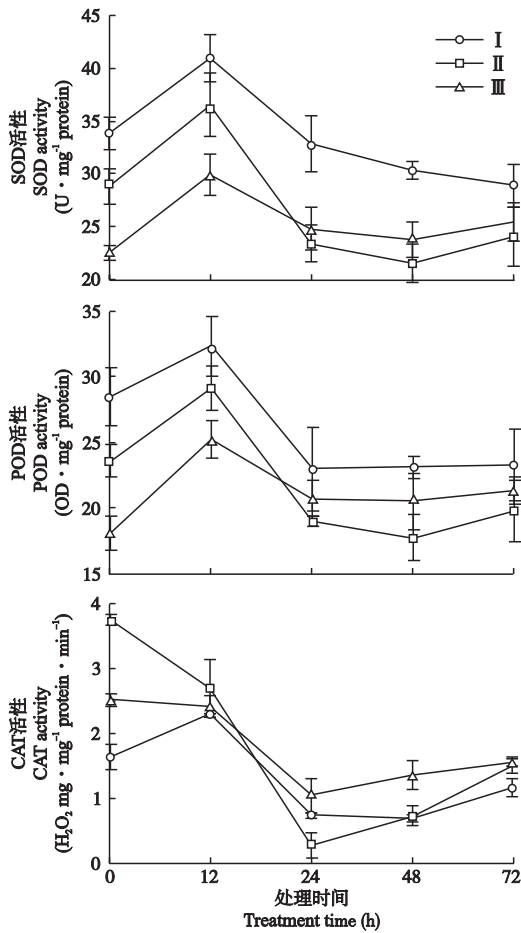


图1 低温胁迫下不同核桃品种叶片 SOD、POD 和 CAT 活性  
Fig.1 SOD, POD and CAT activities in different walnut cultivars under chilling stress.  
I: 哈特雷 Hartley; II: 晋龙 2 号 Jinlong 2; III: 晋龙 1 号 Jinlong 1. 下同 The same below.

SOD 活性存在较大差异,抗寒性强的哈特雷叶片 SOD 活性比抗寒性差的晋龙 2 号高 17.5%,比晋龙 1 号高 50.4%.表明在春季较低的环境温度下(尤其是夜温),抗寒性强的哈特雷叶片 SOD 清除活性氧的能力最强.

低温逆境下,3 个核桃品种叶片 SOD 活性的变化趋势基本一致,均表现为低温胁迫初期,酶活性迅速上升,12 h 时出现峰值,之后逐渐下降;24 h 后,3 个品种叶片 SOD 活性的变化均较平缓,其中抗寒性强的哈特雷和晋龙 1 号 SOD 活性的下降速度均小于抗寒性差的晋龙 2 号.哈特雷的 SOD 活性始终在 3 个品种中最高,晋龙 1 号 SOD 活性的下降幅度最小,酶活性较稳定,到 72 h 时仍高于低温处理前,而晋龙 2 号低温胁迫到 24 h 时,酶活性已经降到了 3 个品种中的最低值,并显著低于低温处理前,说明其清除超氧化物的能力降低.

3 个品种 POD 活性差异及低温处理后的变化趋势与 SOD 类似,低温处理前后 3 个品种 SOD、POD 酶活性之间达到显著正相关.表明二者对低温反应较一致,在清除核桃叶片活性氧过程中均发挥着重要作用.3 个品种叶片 POD 活性的变化趋势也表明,较高的 POD 活性以及 POD 活性的相对稳定对清除活性氧、提高核桃叶片的抗寒性都具有重要作用.低温处理 12 h 后晋龙 2 号叶片 POD 活性迅速下降,清除活性氧能力降低.

展叶期清晨不同抗寒性核桃品种叶片 CAT 活性存在很大差异,以抗寒性强的哈特雷叶片 CAT 活性最低,抗寒性差的晋龙 2 号叶片 CAT 活性最高.低温逆境下,3 个核桃品种叶片 CAT 活性的变化趋势略有差别.低温胁迫初期,抗寒性强的哈特雷叶片 CAT 活性逐渐上升,12 h 时出现峰值,之后缓慢下降,72 h 时酶活性与低温处理前差异不显著.抗寒性较强的晋龙 1 号 CAT 活性在低温胁迫初期缓慢下降,24 h 后逐渐回升,72 h 时酶活性略低于低温处理前,酶活性比较稳定.抗寒性差的晋龙 2 号叶片 CAT 活性在低温胁迫初期迅速下降,24 h 后回升,但显著低于低温处理前,表明随着低温处理引起的组织内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的增加,晋龙 2 号叶片 CAT 的清除能力反而下降,可能会造成活性氧产生与清除之间的平衡被破坏.

2.3 低温逆境下不同核桃品种叶片超氧阴离子含量的变化

从图 2 可以看出,展叶期清晨不同抗寒性核桃品种叶片 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量存在显著差异,以抗寒性差的晋



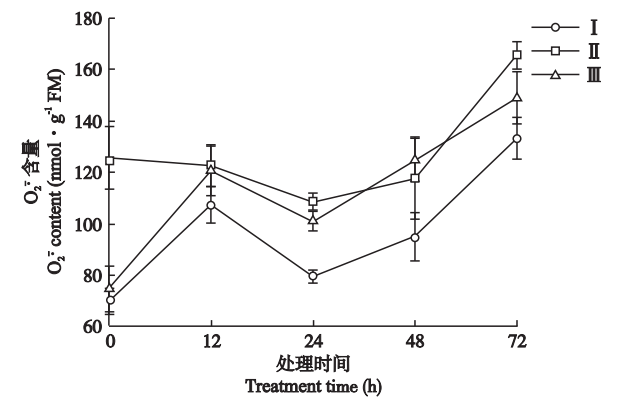


图 2 低温胁迫下不同核桃品种叶片中超氧阴离子含量

Fig.2  $O_2^-$  content in different walnut cultivars under chilling stress.

龙 2 号叶片  $O_2^-$  含量最高,比抗寒性强的哈特雷叶片高出 80.4%.3 个品种叶片  $O_2^-$  含量与其低温胁迫前 CAT 活性大小呈正相关.

低温逆境下,哈特雷和晋龙 1 号叶片  $O_2^-$  含量在低温处理初期明显上升,之后下降,到 24 h 后又逐渐升高;晋龙 2 号叶片  $O_2^-$  含量在低温处理初期随着 SOD 酶活性的上升略有下降,24 h 后又升高.低温胁迫前后,抗寒性强的哈特雷叶片  $O_2^-$  含量始终最低,与其叶片 SOD 的高活性一致.抗寒性差的晋龙 2 号叶片  $O_2^-$  含量始终维持在高水平,从而造成细胞内膜系统的损伤.

2.4 低温逆境对不同抗寒性核桃品种幼叶细胞超微结构的影响

由图 3 可以看出,展叶期核桃叶肉细胞具有较大的液泡,液泡中有少量内含物;叶绿体靠近质膜分布于细胞质中,叶绿体多呈梭形或长椭圆形,内部片层丰富整齐,含有少量脂质球(嗜钺颗粒);线粒体数目较多;质膜及其他细胞内膜清晰完整,抗寒性不同的哈特雷和晋龙 2 号幼叶细胞超微结构没有显著差异.

核桃幼叶于 1℃下处理 12 h 时,两品种细胞中线粒体数目明显增多,部分大液泡被分割成多个小液泡.低温处理 24 h 时两品种细胞的超微结构与处理 12 h 时的差异不显著.低温处理 48 h 时,2 个品种的叶片没有明显冷害症状.此时超微结构显示,抗寒性差的晋龙 2 号叶绿体膨胀,从梭形或长椭圆形向圆形变化,基粒片层仍较整齐,但有的叶绿体中基粒片层变薄,脂质球数目增多;抗寒性强的哈特雷细胞中叶绿体没有明显变化.低温处理 72 h 时,哈特雷叶肉细胞的超微结构完整,与低温胁迫前相比,只是

线粒体数目增多,液泡分割,少数叶绿体变形,叶片外观没有明显冷害症状.而抗寒性差的晋龙 2 号叶绿体普遍膨胀变圆,部分叶绿体被膜和质膜的清晰度下降,同时 1 年生枝条的顶部小叶表现明显冷害症状.此时,细胞中线粒体和细胞核的结构基本正常,冷稳定性较强,表明叶绿体和质膜是细胞结构中对低温最敏感的部位.

3 讨 论

3.1 低温逆境下抗氧化系统与核桃抗寒性的关系

许多研究证实,细胞内膜系统的稳定性与植物抗寒性呈正相关<sup>[7,20]</sup>,在清除自由基、维护膜的稳定性中,抗氧化酶系统起着重要作用,SOD、POD、CAT 是植物防止膜脂过氧化的酶促防御体系中重要的保护酶,在低温逆境中所起的作用已得到证明<sup>[5-7]</sup>.超氧阴离子伤害植物的机理之一在于参与启动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用,从而破坏膜结构.低温胁迫干扰了植物细胞中活性氧产生与清除之间的平衡,活性氧在细胞中积累使蛋白质氧化和生物膜膜脂受到伤害,导致植物受损<sup>[5-6]</sup>.有研究表明,低温引起香蕉和大蕉叶片 SOD 活性的降低,但抗寒性强的香蕉 SOD 活性下降幅度比抗寒性弱的香蕉小<sup>[21]</sup>.15℃/15℃的昼/夜低温引起黄瓜叶片 CAT 活性下降,但抗寒性强的品种下降幅度小<sup>[7]</sup>.在 11℃低温胁迫下,烟草叶片中 SOD、POD 活性,以及  $H_2O_2$  和超氧阴离子浓度均升高,抗寒性强的品种中 SOD、POD 活性高于抗寒性差的,而  $H_2O_2$  和超氧阴离子浓度小于抗寒性差的<sup>[14]</sup>.本研究表明,在 3 个核桃品种中,抗寒性强的哈特雷叶片 SOD、POD 活性始终最高,超氧阴离子含量最低;抗寒性差的晋龙 2 号 SOD 和 POD 活性下降迅速,清除活性氧的能力降低,超氧阴离子含量始终处于高水平,最终叶肉细胞中质膜及叶绿体被膜清晰度下降,叶片表现出明显冷害症状.表明低温逆境下稳定、较高的 SOD、POD 活性在清除核桃叶片活性氧过程中发挥着重要作用,二者通过清除活性氧、防止膜质过氧化,降低了细胞内膜系统的破坏程度,使哈特雷品种表现出较强抗寒性.因此,SOD、POD 活性以及超氧阴离子含量均可作为春季展叶期核桃叶片抗寒性鉴定的生理生化指标.

活性氧具有双重作用,一是加重细胞损伤,二是发出信号以激活防御系统<sup>[22]</sup>.Wang 等<sup>[23]</sup>利用外源  $H_2O_2$  预处理沟叶结缕草(*Zoysia matrella*),能显著提高常温下 CAT 等抗氧化酶的活性,随着低温胁迫, $H_2O_2$  预处理减轻了沟叶结缕草  $H_2O_2$  水平的上升,

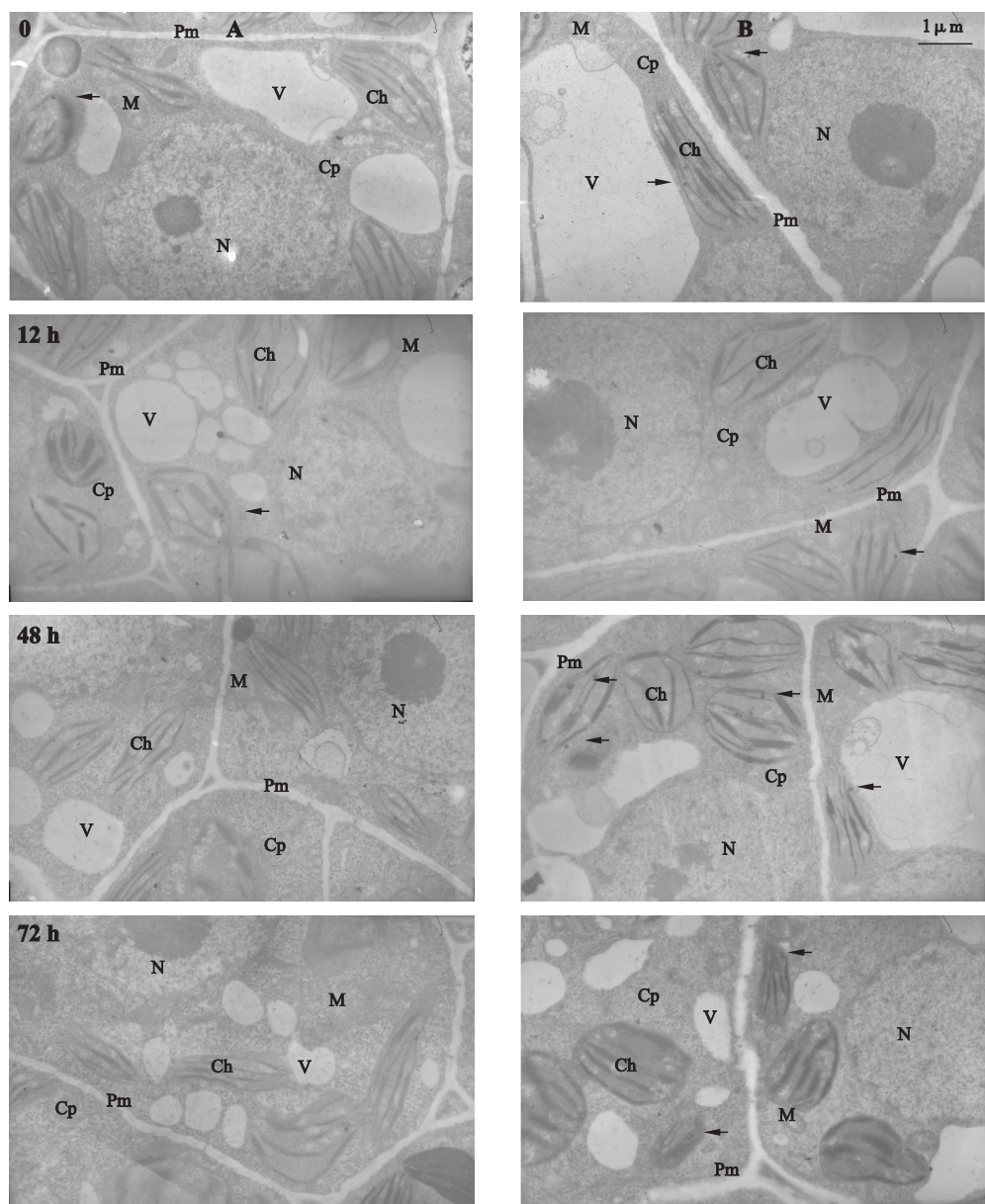


图3 ‘哈特雷’(A)和‘晋龙2号’(B)核桃幼叶经1℃低温处理0、12、48和72 h时的超微结构  
**Fig.3** Ultrastructure of walnut mesophyll cells of ‘Hartley’ (A) and ‘Jinlong 2’ (B) at 1 °C for 0, 12, 48 and 72 h.  
Ch: 叶绿体 Chloroplast; N: 细胞核 Nucleus; Pm: 质膜 Plasma membrane; V: 液泡 Vacuole; M: 线粒体 Mitochondrion; Cp: 细胞质 Cytoplasm. 箭头指示叶绿体中的脂质球 Arrows indicated some lipid microspheres in chloroplast.

提高了CAT等抗氧化酶的活性.表明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是一种信号分子,能诱导抗氧化酶的产生,防止低温引起的氧化损伤.本研究中,低温逆境下CAT活性与核桃品种的抗寒性没有直接关系,但抗寒性强的品种中CAT能保持较稳定的活性,从而行使其分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的功能,这与红松(*Pinus koraiensis*)<sup>[24]</sup>的研究结果一致.核桃展叶期清晨气温多在15℃以下,从3个核桃品种叶片中超氧阴离子含量与其CAT活性呈正相关可以推测,核桃叶片中CAT活性可能与叶片中活性氧的含量有关,即轻度低温或低温胁迫初期CAT活性主要受叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的诱导,但随着胁迫

时间延长,CAT活性受低温影响很大.核桃叶片中CAT活性与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和低温处理之间的关系需要进一步研究.

3.2 低温胁迫下叶片超微结构变化与核桃抗寒性的关系

研究表明,展叶期核桃叶肉细胞一般具有较大的液泡,液泡中有少量内含物.随着低温胁迫,液泡分割,内含物增多.在黄瓜<sup>[20]</sup>、樟树(*Cinnamomum camphora*)<sup>[25]</sup>的叶片中也观察到这种现象.表明低温胁迫下,液泡通过吞噬、分解内含物等形成具有渗透性的化合物,提高渗透调节能力,达到避免低温伤害

的效果,这是细胞适应逆境的一种表现。

线粒体是氧化磷酸化、释放能量的场所,其数目与细胞的生理功能及需求密切相关,一般需要能量较多的细胞中线粒体数目也较多<sup>[26]</sup>。本研究发现,春季核桃叶肉细胞中有较多的线粒体,随着低温胁迫,线粒体数目明显增多,从而为低温条件下细胞提供更多的能量,以减轻低温伤害。在低温胁迫下,翠南报春 (*Primula sieboldai*)<sup>[27]</sup>、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[28]</sup> 叶片中也观察到线粒体数目增多。这可能是植物细胞对低温逆境的一种适应性变化。

有研究表明,叶绿体是低温伤害最早和最严重的细胞器,而线粒体、细胞核等细胞器对低温的敏感性差<sup>[15,29]</sup>,抗寒性强的品种中叶绿体等细胞器的冷稳定性强于抗寒性差的品种<sup>[25,30]</sup>,本研究结果与此一致。随着低温胁迫时间延长,抗寒性差的晋龙 2 号细胞中叶绿体和质膜损伤明显。质膜和叶绿体被膜是众多活性蛋白存在的部位,其受损必然引起细胞代谢的紊乱,造成低温寒害。

超氧阴离子伤害植物的机理之一是参与启动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用,从而破坏膜结构<sup>[6]</sup>,脂质球的积累是叶绿体类囊体膜受到伤害而降解产生脂类物质的结果<sup>[31-32]</sup>。有研究表明,休眠季节抗寒性较差的圆柏 (*Sabina chinensis*) 叶绿体受到低温伤害,脂质球数目增多,而祁连圆柏 (*S. przewalskii*) 类囊体的结构受到影响较小,脂质球数目少<sup>[30]</sup>。在低温损伤的烟草叶绿体中也发现了脂质球数目增多<sup>[14]</sup>。本研究中,抗寒性差的晋龙 2 号在低温逆境下始终存在较高的超氧阴离子浓度,可能造成了叶绿体类囊体膜等细胞内膜系统的降解,随着低温持续,晋龙 2 号叶绿体被膜和质膜的清晰度下降,叶绿体中基粒片层变薄,同时出现较多的脂质球;而抗寒性强的哈特雷叶片中超氧阴离子浓度低,叶绿体中脂质球少,细胞内膜系统完整。这表明核桃细胞内膜系统的完整性与超氧阴离子积累之间可能存在一定的相互关系。

## 参考文献

- [1] Xi R-T (郝荣庭), Zhang Y-P (张毅萍). Chinese Walnut. Beijing: China Forestry Publishing House, 1992 (in Chinese)
- [2] Chen J-H (陈金海), Luo R-X (罗仁仙). Influence of late frost and freezing damage on walnut industry and some countermeasures. *Nonwood Forest Research* (经济林研究), 2011, **29**(2): 119-123 (in Chinese)
- [3] Tian J-H (田景花), Wang H-X (王红霞), Gao Y (高 仪), et al. Evaluation on cold resistance of four *Juglans* species in leaf-expansion period. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2012, **39**(12): 2439-2446 (in Chinese)
- [4] Tian J-H (田景花), Wang H-X (王红霞), Gao Y (高 仪), et al. Assessment of freezing tolerance of *Juglans germplasm*s by using annual dormant branches. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2013, **40**(6): 1051-1060 (in Chinese)
- [5] Chen LJ, Xiang HZ, Miao Y, et al. An overview of cold resistance in plants. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2014, **200**: 237-245
- [6] Chen L-S (陈立松), Liu X-H (刘星辉). Stress Physiology of Fruit Trees. Beijing: China Agriculture Press, 2003 (in Chinese)
- [7] Xu PL, Guo YK, Bai JG, et al. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum*, 2008, **132**: 467-478
- [8] Liu WP, Su SC, Liu X, et al. Comparison of different cultivars of blueberry overwintering ability in Qingdao of China. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, **3**: 391-396
- [9] Fortunato AS, Lidon FC, Batista-Santos P, et al. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 2009, **167**: 333-342
- [10] Wang WB, Kim YH, Lee HS, et al. Differential antioxidant activities in two alfalfa cultivars under chilling stress. *Plant Biotechnology Reports*, 2009, **3**: 301-307
- [11] Bafeel SO, Ibrahim MM. Antioxidants and accumulation of alpha-tocopherol induce chilling tolerance in *Medicago sativa*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2008, **10**: 593-598
- [12] Xiang K (相 昆), Zhang M-Y (张美勇), Xu Y (徐颖), et al. Cold-tolerance of walnut cultivars: A comprehensive evaluation. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2011, **22**(9): 2325-2330 (in Chinese)
- [13] Gechev T, Willekens H, van Montagu M, et al. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*, 2003, **160**: 509-515
- [14] Cui HW, Ma WG, Hu J, et al. Chilling tolerance evaluation, and physiological and ultrastructural changes under chilling stress in tobacco. *African Journal of Agricultural Research*, 2012, **7**: 3349-3359
- [15] Kratsch HA, Wise RR. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*, 2000, **23**: 337-350
- [16] Yadav SK. Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 2010, **30**: 515-527
- [17] Li H-S (李合生). The Experiment Principle and Technique for Plant Physiology and Biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese)
- [18] Xiao M-X (肖美秀), Lin W-X (林文雄), Chen D-M



- (陈冬梅), *et al.* Effects of Cd on the cell membrane lipid peroxidation and activity of protecting enzymes in seedlings of rice with different tolerance to Cd pollutant. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* (中国生态农业学报), 2006, **14**(4): 256–258 (in Chinese)
- [19] Wang A-G (王爱国), Luo G-H (罗广华). Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1990(6): 55–57 (in Chinese)
- [20] Tian J-H (田景花), Zhang H (张红), Li M (李明), *et al.* Effect of APM on the ultrastructure cold stability of cucumber young leaf cells. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society* (电子显微学报), 2002, **21**(2): 129–133 (in Chinese)
- [21] Zhou B-Y (周碧燕), Liang L-F (梁立峰), Huang H-B (黄辉白), *et al.* Effects of low temperature and paclobutrazol on superoxide dismutase and abscisic acid of bananas (*Musa* spp.). *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 1995, **22**(4): 331–335 (in Chinese)
- [22] Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, **57**: 779–795
- [23] Wang Y, Li J-L, Wang J-Z, *et al.* Exogenous  $H_2O_2$  improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system. *Plant Growth Regulation*, 2010, **61**: 195–204
- [24] Li J (李晶), Yan X-F (阎秀峰), Zu Y-G (祖元刚). Generation of activated oxygen and change of cell defense enzyme activity in leaves of Korean pine seedling under low temperature. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2000, **42**(2): 148–152 (in Chinese)
- [25] Wang N (王宁), Dong Y-Y (董莹莹), Su J-L (苏金乐). Comparison of leaf blade ultrastructures of two camphor varieties under cold stress. *Journal of Northwest A&F university* (Nature Science) (西北农林科技大学学报: 自然科学版), 2013, **41**(7): 106–112 (in Chinese)
- [26] Wang K-R (汪堃仁), Xue S-B (薛绍白), Liu H-T (柳惠图). *Cell Biology*. Beijing: Beijing Normal University Press, 1998 (in Chinese)
- [27] Zhou Y-W (周蕴薇). Adapted responses of mesophyll cell ultrastructure in *Primula sieboldai* leaves cultured at different low temperatures. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2006, **33**(6): 1361–1364 (in Chinese)
- [28] Vella NGF, Joss TV, Roberts TH. Chilling-induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming. *Protoplasma*, 2012, **249**: 1137–1149
- [29] Zheng G-H (郑国华), Zhang H-Y (张贺英). Effects of chilling stress on cell ultrastructure and membrane permeability and protective enzyme activity in young loquat fruits. *Chinese Journal of Tropical Crops* (热带作物学报), 2008, **29**(6): 730–737 (in Chinese)
- [30] Zhang Y-F (张有福), Chen Y-P (陈银萍), Zhang M-X (张满效), *et al.* Seasonal changes in foliar micro- and ultra structure of two *Sabina* species and their relationships with cold tolerance. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(8): 1393–1397 (in Chinese)
- [31] Steinmüller D, Tevini M. Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta*, 1985, **163**: 91–96
- [32] Yu Y (于颖), Liu Y-Y (刘元英), Luo S-G (罗盛国), *et al.* Effects of selenium on soybean chloroplast ultra-structure and microelement content of soybean leaves under continuous cropping stress. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2003, **14**(4): 573–576 (in Chinese)

---

**作者简介** 田景花,女,1969年生,博士研究生.主要从事园艺作物抗寒生理研究. E-mail: yytjh@hebau.edu.cn

**责任编辑** 孙菊

---