

H₂O₂ 预处理及高温胁迫下杜鹃叶片活性氧及抗氧化酶亚细胞定位分析

耿兴敏, 肖丽燕, 赵 晖, 刘 攀

(南京林业大学 风景园林学院 南京 210037)

摘 要:为明确 H₂O₂ 在杜鹃耐热性形成中的作用机制以及高温胁迫下杜鹃活性氧清除系统的亚细胞分布, 该研究以 3 个耐热性不同的杜鹃品种为实验材料, 进行 H₂O₂ 预处理后再进行高温胁迫, 分析叶绿体、线粒体和细胞溶质等亚细胞组分中活性氧产生和清除系统的变化。结果表明: (1) ‘胭脂蜜’、‘红月’、‘红珊瑚’分别为耐热、较耐热和热敏感品种。(2) 高温胁迫下, 3 个杜鹃品种 H₂O₂ 含量的亚细胞分布为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 各亚细胞组分中超氧阴离子自由基(O₂⁻)产生速率差异不显著; 3 个杜鹃品种均以细胞溶质中的丙二醛(MDA)含量最高, 且热敏感杜鹃‘红月’和‘红珊瑚’中 MDA 亚细胞分布与 H₂O₂ 相一致, 但‘胭脂蜜’线粒体中 MDA 含量高于叶绿体。(3) 高温胁迫下, ‘胭脂蜜’和‘红珊瑚’亚细胞组分超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性排序为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, ‘红月’相应排序为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体; 过氧化氢酶(CAT)活性在‘胭脂蜜’和‘红月’亚细胞组分中的排序相同, 线粒体中 CAT 活性高于细胞溶质和叶绿体, 而在‘红珊瑚’中叶绿体 CAT 活性最高。(4) H₂O₂ 预处理可以通过增强耐热杜鹃的抗氧化防御能力, 减轻杜鹃幼苗的过氧化损伤, 尤其是对耐热性较差的杜鹃品种效果显著。研究发现, 杜鹃叶片 MDA、活性氧、抗氧化酶活性的亚细胞分布在高温胁迫下存在品种差异, MDA 亚细胞分布与活性氧的分布并不完全一致, 热敏感杜鹃‘红月’和‘红珊瑚’叶绿体所受的过氧化损伤程度高于耐热品种‘胭脂蜜’; 高温胁迫下, H₂O₂ 预处理对不同杜鹃品种各亚细胞器的活性氧和抗氧化酶的影响程度也表现出品种间差异。

关键词: 杜鹃; 过氧化氢; 活性氧清除系统; 叶绿体; 线粒体; 细胞溶质

中图分类号: Q945.6; S685.21 **文献标志码:** A

Sub-cellular Localization of ROS-scavenging System in *Rhododendron* Leaves under Heat Stress and H₂O₂ Pretreatment

GENG Xingmin, XIAO Liyan, ZHAO Hui, LIU Pan

(College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

Abstract: In order to make clear the response mechanism of antioxidant defense to heat stress at the subcellular level and hydrogen peroxide-induced heat tolerance of rhododendrons, we used three *Rhododendron* cultivars with different heat tolerance as experimental materials to analyze the effects of heat stress and H₂O₂ pre-treatment on the level of reactive oxygen species (ROS) and the activities of antioxidant system in the chloroplasts, mitochondria and cytosol of *Rhododendron* leaves. The results showed that: (1) the order of the three *Rhododendron* cultivars according to their heat resistance were *R. obtusum* ‘Yanzhimi’, *R. ‘Hongyue’* and *R. ‘Hongshanhu’*, respectively. (2) Under heat stress, the subcellular distribution of H₂O₂: cytosol > chloroplast > mitochondria. There was no significant difference in the production rate of superoxide radical (O₂⁻) in three subcellular organelles. The MDA content in cytosol was the highest in

收稿日期: 2018-12-26; 修改稿收到日期: 2019-04-23

基金项目: 江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A063)

作者简介: 耿兴敏(1976-), 女, 博士, 教授, 主要从事园林植物种质创新与生理生化的研究。E-mail: xmgeng76@163.com

three *Rhododendron* cultivars, the subcellular distribution of MDA in *R. 'Hongyue'* and *R. 'Hongshanhu'* was the same with H_2O_2 distribution, but MDA in the mitochondria of *R. obtusum 'Yanzhimi'* was higher than that in the chloroplast. (3) Under heat stress, the order of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities in *R. obtusum 'Yanzhimi'* and *R. 'Hongshanhu'*: cytosol > chloroplast > mitochondria, however in *R. 'Hongyue'*, the order was cytosol > mitochondria > chloroplast. The subcellular distribution of catalase (CAT) in *R. obtusum 'Yanzhimi'* was the same with *R. 'Hongyue'*, their CAT activity in the mitochondria was higher than that in the cytosols and chloroplasts, but in *R. 'Hongshanhu'* the activity of CAT in the chloroplasts was the highest. (4) H_2O_2 pretreatment could improve the heat tolerance of rhododendron seedlings by enhancing the antioxidant defense ability of reducing the peroxidative damage under heat stress especially for the seedlings with poor heat tolerance. The results indicated that the subcellular distributions of ROS, MDA and antioxidant enzymes were different among three cultivars. The distribution of MDA was not completely consistent with that of ROS, and the chloroplasts of heat-sensitive cultivars *R. 'Hongyue'* and *R. 'Hongshanhu'* were more susceptible to oxidative damage than those of *R. obtusum 'Yanzhimi'*. The effects of H_2O_2 pretreatment on the level of ROS and the activities of antioxidant enzymes in subcellular organelles appeared to be different among the three cultivars.

Key words: *Rhododendron*; hydrogen peroxide; ROS-scavenging system; chloroplast; mitochondrion; cytosol

杜鹃花作为中国传统十大名花之一,是杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃属(*Rhododendron* L.)植物的总称,具有很高的观赏和应用价值。中国野生杜鹃资源主要分布在海拔1 500~4 000 m地区,喜冷凉环境,夏季高温成为国内杜鹃花引种栽培和推广应用的主要限制因子之一^[1]。目前杜鹃耐热性的相关研究主要集中在高温胁迫下活性氧清除系统、渗透调节物质和光合作用等的响应以及解剖结构等方面^[2-6]。

高温胁迫下活性氧的过量积累会不同程度上引起膜脂过氧化,造成细胞膜受损。杜鹃耐热性强弱与抗氧化防御能力有关^[3-6],耐热杜鹃种(或品种)在高温胁迫下可以维持较高的抗氧化酶活性,减轻杜鹃叶片所受的过氧化胁迫,提高耐热性。不同类型逆境胁迫下植物叶片各细胞器的活性氧水平和所受的过氧化伤害程度存在差异^[7],从而导致不同抗氧化酶和抗氧化物质在亚细胞水平上分布的差异^[8]。高温胁迫下杜鹃叶片各亚细胞损伤程度存在差异,叶绿体对高温胁迫最为敏感,其次是线粒体和膜结构^[9],这或许与各亚细胞器抗氧化防御能力的不同有关,但目前高温胁迫下杜鹃各亚细胞组分活性氧的产生和清除系统的响应研究还鲜见报道,各亚细胞组分的抗氧化防御机制尚不明确。

过氧化氢(H_2O_2)分子量较小,容易在细胞中扩散,如果没有被及时清除,会被转化成为毒性更强的($HO\cdot$),因此被认为对细胞有很大的毒性^[10]。同时 H_2O_2 也能扩散进入细胞,激活植物的防御应答。近年来大量研究表明, H_2O_2 作为信号分子在植物逆境适应中发挥着重要作用^[11],外源 H_2O_2 可以通过调控抗氧化酶基因的表达来诱导抗氧化酶活性增

强,从而减轻逆境胁迫伤害,提高植物在逆境下的适应能力^[12]。据报道,热锻炼能够增强玉米对高温、干旱、土壤盐渍等各种胁迫的抗性,并与 H_2O_2 积累有关,适宜浓度的 H_2O_2 外部处理也可以诱导玉米对这几种逆境胁迫的适应性^[13];干旱胁迫下 H_2O_2 在小麦叶片中的积累可增强小麦的抗旱性^[14], H_2O_2 在质外体的积累增强了黄瓜嫁接苗的耐热性^[15]。

因此,本研究以耐热性不同的3个杜鹃品种为实验材料进行高温胁迫处理,分析高温胁迫下叶绿体、线粒体和细胞溶质等亚细胞组分中活性氧产生和主要抗氧化酶活性的变化,以期能够在亚细胞水平上明确高温胁迫下杜鹃的活性氧调控机制。同时,研究 H_2O_2 诱导的杜鹃耐热性与抗氧化系统的关系,探讨 H_2O_2 在杜鹃耐热性形成中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料培养与处理

以热敏感性不同的杜鹃品种‘胭脂蜜’(耐热)、“红珊瑚”(热敏感)和‘红月’(中等耐热)2年生扦插苗为试验材料,选择大小一致、生长健壮的盆栽杜鹃幼苗(1株/盆)在人工气候培养箱中进行温度处理。具体处理包括:①高温胁迫处理(昼42℃/夜30℃);② H_2O_2 +高温处理(先用0.05% H_2O_2 均匀、等量喷施植株,24h后再进行高温胁迫);③对照(放置在25℃温室中)。高温胁迫温度以及 H_2O_2 喷施浓度根据预备实验进行设置,保证3个杜鹃品种在高温胁迫下出现显著性差异,以及 H_2O_2 提高杜鹃耐热性效果。为避免干旱胁迫,盆底放置托盘补充水分,每个处理重复3次,每重复10株苗。处

理 72 h 后采取叶片样品,每个处理取样都在植株中部相同位置,每处理取 10 g 叶片,叶片保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,直到用于各项指标分析。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 亚细胞组分的分离和提取

参考于飞等^[8]的方法,取 10 g 叶片样品,加入 30 mL 预冷的提取缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl, 0.35 mmol/L 山梨醇, 2 mmol/L EDTA 和 2.5 mmol/L DTT, pH=7.5)和少许石英砂在冰水中迅速研磨,然后过滤、离心,弃沉淀,上清液再次离心,沉淀为叶绿体部分,上清液部分继续离心,所得沉淀为线粒体部分,上清液为细胞溶质部分。将所得的叶绿体和线粒体部分分别用提取液洗涤 1 次,重复离心,取沉淀用 5 mL 提取缓冲液悬浮。

1.2.2 亚细胞组分中 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 含量测定

参照 Zandalinas 等^[16]的方法测定 H_2O_2 含量;用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量;用羟胺氧化法测定超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)水平变化。

1.2.3 抗氧化酶活性分析

取亚细胞悬浮液 0.5 mL 加 3 mL 磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH=7.8)于 10 mL 离心管中, $10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 上清液即为样品待测液。参照 Zandalinas 等^[16]的方法进行超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶

(CAT)活性测定,采用愈创木酚法进行过氧化物酶(POD)活性测定。

1.3 数据处理

采用 SPSS19.0 进行多重比较和方差分析。

2 结果与分析

2.1 各品种杜鹃幼苗热害症状变化比较

单一高温胁迫处理 3 d 后,杜鹃品种‘胭脂蜜’叶片出现轻度的下垂和反卷,顶部个别幼嫩叶片枯萎;品种‘红月’近半数的叶片下垂、枯萎或者反卷;品种‘红珊瑚’所受的热伤害最严重,整株几乎所有叶片下垂、反卷或枯萎甚至落叶(图 1)。同时,与同期直接高温处理区相比,经过 H_2O_2 预处理的 3 个杜鹃品种植株叶片受热害程度明显减轻,且以品种‘红月’和‘红珊瑚’的处理效果尤其显著。可见,杜鹃品种‘胭脂蜜’的耐热性最强,‘红月’次之,‘红珊瑚’最弱; H_2O_2 预处理能够增强杜鹃植株的耐热性,并以耐性较弱品种的处理效果更为显著。

2.2 高温胁迫对杜鹃各亚细胞组分 MDA 含量的影响

表 1 显示,耐热杜鹃品种‘胭脂蜜’叶片各亚细胞组分 MDA 含量在各处理下均表现为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体,且细胞溶质均明显高于其他组分,

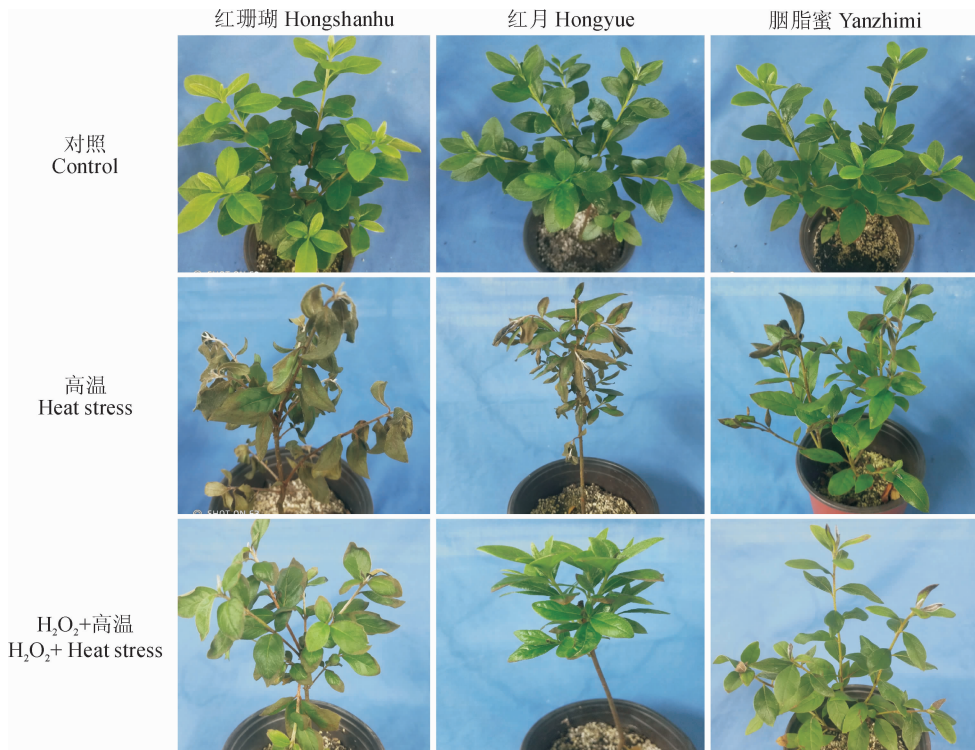


图 1 高温胁迫 3 d 后 3 个杜鹃品种的热害形态变化

Fig. 1 Morphological changes of three *Rhododendron* cultivars after 3 days under heat stress

表 1 高温胁迫及 H₂O₂ 预处理下 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分中 MDA 含量变化Table 1 MDA content in different sub-cellular fractions of three *Rhododendron* cultivars under heat stress and H₂O₂ pretreatment

品种 Cultivar	亚细胞组分 Sub-cellular fraction	MDA 含量 MDA content/($\mu\text{mol/g}$)		
		对照 Control	高温胁迫 Heat stress	H ₂ O ₂ + 高温胁迫 H ₂ O ₂ + Heat stress
胭脂蜜 Yanzhimi	叶绿体 Chloroplast	0.241 ± 0.071a(c)	0.614 ± 0.177a(b)	0.592 ± 0.097a(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.823 ± 0.020a(b)	0.986 ± 0.112a(b)	0.829 ± 0.032a(b)
	细胞溶质 Cytosol	1.545 ± 0.066a(a)	1.676 ± 0.105a(a)	1.469 ± 0.071a(a)
红月 Hongyue	叶绿体 Chloroplast	0.188 ± 0.050b(c)	1.076 ± 0.123a(b)	0.534 ± 0.114b(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.849 ± 0.044a(b)	0.878 ± 0.080a(b)	0.842 ± 0.078a(b)
	细胞溶质 Cytosol	1.300 ± 0.106b(a)	2.244 ± 0.289a(a)	1.820 ± 0.092ab(a)
红珊瑚 Hongshanhu	叶绿体 Chloroplast	0.626 ± 0.005a(b)	0.768 ± 0.013a(b)	0.767 ± 0.098a(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.676 ± 0.036a(b)	0.761 ± 0.028a(b)	0.714 ± 0.023a(b)
	细胞溶质 Cytosol	1.848 ± 0.030b(a)	2.834 ± 0.247a(a)	2.654 ± 0.074a(a)

注: 数字后的不同字母表示杜鹃在对照、高温胁迫及 H₂O₂ + 高温胁迫之间的差异显著性 ($P < 0.05$); 括号内的字母表示同一品种叶绿体、线粒体和细胞溶质之间的差异显著性。下同

Note: Different normal letters within the same row indicate significant difference among the control, heat stress and H₂O₂ + heat stress treatments at 0.05 level ($P < 0.05$); The different letters in the brackets within the column indicate difference among the chloroplast, mitochondrion and cytosol of the same cultivar. The same as below

即细胞溶质组分都为 MDA 主要分布区; 叶片各组分 MDA 含量在高温胁迫后均比对照有所提高, H₂O₂ 预处理后又不同程度降低, 但与对照相近或者稍高, 处理之间均无显著差异。就较耐热品种‘红月’而言, 叶片各亚细胞组分 MDA 含量在对照和 H₂O₂ 预处理条件下均表现为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体, 而在直接高温处理下 MDA 含量表现为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 细胞质组分明显最高, 为 MDA 主要分布区, 叶绿体和线粒体差异不显著, 叶片叶绿体和细胞溶质 MDA 含量在高温胁迫后均比对照显著增加, 而线粒体稍有增加, 各组分在 H₂O₂ 预处理后又不同程度降低, 但均与对照无显著差异。在热敏感品种‘红珊瑚’中, 叶片各亚细胞组分 MDA 含量在对照条件下表现为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体, 而在直接高温和 H₂O₂ 预处理条件下则表现为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 其中的细胞溶质明显高于其余组分, 为 MDA 主要分布区, 而叶绿体和线粒体之间始终相近; 叶片细胞溶质 MDA 含量在高温胁迫后均比对照明显增加, 又在 H₂O₂ 预处理后有所降低, 但仍显著高于对照, 其余组分 MDA 含量在各处理下均无显著变化。可见, 3 个杜鹃品种叶片亚细胞组分 MDA 在常温对照处理下均表现为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体, 但‘红珊瑚’线粒体和叶绿体中 MDA 的分布差异不显著。耐热杜鹃品种亚细胞组分 MDA 的分布和含量水平能在高

温胁迫下保持稳定, 较耐热品种和热敏感品种叶绿体 MDA 分布均都在高温胁迫下高于线粒体, 它们叶绿体和细胞溶质 MDA 含量水平比常温对照提高(‘红珊瑚’叶绿体中 MDA 升高不显著), 但较耐热品种的变化能被 H₂O₂ 预处理恢复, 而热敏感品种则不能恢复; 各品种细胞溶质组分 MDA 含量在各处理下始终最高, 为 MDA 主要分布区。

2.3 高温胁迫对杜鹃叶片亚细胞中 ROS 水平的影响

2.3.1 O₂⁻ 产生速率 ROS 主要由 O₂⁻ 和 H₂O₂ 等组成, 主要产生于叶绿体、线粒体和细胞溶质等亚细胞器中^[10,17]。表 2 显示, 耐热品种‘胭脂蜜’叶片各亚细胞组分 O₂⁻ 产生速率在对照条件下表现为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体, 在直接高温处理下表现为线粒体 > 叶绿体 > 细胞溶质, 而在 H₂O₂ 预处理表现为叶绿体 > 细胞溶质 > 线粒体, 但 O₂⁻ 产生速率在 3 个亚细胞组分间的分布始终相差不大; 各亚细胞组分中仅叶绿体 O₂⁻ 产生速率在高温胁迫后比对照显著增加, 在 H₂O₂ 预处理后稍有降低, 但仍显著高于对照; 线粒体和细胞溶质 O₂⁻ 产生速率在高温胁迫和 H₂O₂ 预处理后均与对照无显著差异。同时, 较耐热品种‘红月’叶片各亚细胞组分 O₂⁻ 产生速率在对照条件下表现为线粒体 > 叶绿体 > 细胞溶质, 而在直接高温处理下 O₂⁻ 产生速率表现为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体, 在 H₂O₂ 预处理

表 2 高温胁迫及 H_2O_2 预处理下 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分中 O_2^- 产生速率的变化Table 2 O_2^- production rate in different sub-cellular fractions of three *Rhododendron* cultivars under heat stress and H_2O_2 pretreatments

品种 Cultivar	亚细胞组分 Sub-cellular fraction	O_2^- 产生速率 O_2^- Production rate / ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		
		对照 Control	高温胁迫 Heat stress	H_2O_2 + 高温胁迫 H_2O_2 + Heat stress
胭脂蜜 Yanzhimi	叶绿体 Chloroplast	0.999 ± 0.004b(a)	1.058 ± 0.103a(a)	1.047 ± 0.013a(a)
	线粒体 Mitochondrion	1.025 ± 0.004a(a)	1.062 ± 0.021a(a)	1.033 ± 0.005a(a)
	细胞溶质 Cytosol	1.033 ± 0.015a(a)	1.039 ± 0.017a(a)	1.037 ± 0.004a(a)
红月 Hongyue	叶绿体 Chloroplast	1.020 ± 0.006a(a)	1.045 ± 0.016a(a)	1.022 ± 0.005a(a)
	线粒体 Mitochondrion	1.035 ± 0.010a(a)	1.053 ± 0.026a(a)	1.039 ± 0.004a(a)
	细胞溶质 Cytosol	1.015 ± 0.007b(a)	1.086 ± 0.017a(a)	1.037 ± 0.018ab(a)
红珊瑚 Hongshanhua	叶绿体 Chloroplast	1.052 ± 0.005a(a)	1.082 ± 0.026a(a)	1.048 ± 0.007a(ab)
	线粒体 Mitochondrion	1.027 ± 0.004a(a)	1.082 ± 0.023a(a)	1.077 ± 0.008a(a)
	细胞溶质 Cytosol	1.025 ± 0.011b(a)	1.143 ± 0.009a(a)	1.029 ± 0.009b(b)

后表现为线粒体 > 细胞溶质 > 叶绿体, 但 O_2^- 产生速率在 3 个亚细胞组分间的分布始终相差不大; 叶片各组分仅细胞溶质 O_2^- 产生速率在高温胁迫后比对照明显加快, 而在 H_2O_2 预处理后恢复至对照水平, 叶绿体和线粒体 O_2^- 产生速率在各处理下与对照均无显著差异。另外, 热敏感品种‘红珊瑚’叶片各亚细胞组分 O_2^- 产生速率在对照条件下表现为叶绿体 > 线粒体 > 细胞溶质, 而在直接高温表现为细胞溶质 > 叶绿体和线粒体, 在 H_2O_2 预处理条件下则表现为线粒体 > 叶绿体 > 细胞溶质, 线粒体与细胞溶质差异显著; 各组分中仅细胞溶质 O_2^- 产生速率在高温胁迫下比对照显著升高, 经 H_2O_2 预处理后恢复至对照水平, 叶绿体和线粒体 O_2^- 产生速率在直接高温胁迫和 H_2O_2 预处理后均无显著变化。

2.3.2 H_2O_2 含量 表 3 显示, ‘胭脂蜜’叶片各亚细胞组分 H_2O_2 含量在各处理条件下均表现为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 且细胞溶质与叶绿体和线粒体差异显著, 分别是叶绿体、线粒体的 3.71 ~ 4.26 倍、3.99 ~ 4.44 倍; 叶片各组分 H_2O_2 含量在高温胁迫后均比对照显著增加, 而在 H_2O_2 预处理后叶绿体和线粒体 H_2O_2 含量又不同程度降低, 并恢复至对照水平, 而细胞溶质中 H_2O_2 含量反而有所增加, 仍显著高于对照。‘红月’叶片各亚细胞组分 H_2O_2 含量在各处理条件下也始终表现为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 且细胞溶质与叶绿体和线粒体差异显著, 分别是叶绿体、线粒体的 2.70 ~ 3.10 倍、2.85 ~ 3.20 倍; 叶片叶绿体 H_2O_2 含量在各处理下始终无显著变化, 线粒体和细胞溶质 H_2O_2 含

量在高温胁迫后均比对照显著增加, 而在 H_2O_2 预处理后又显著降低, 但仍显著高于对照。‘红珊瑚’叶片各亚细胞组分 H_2O_2 含量各处理条件下均表现为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 细胞溶质与叶绿体和线粒体差异显著, 且细胞溶质分别是叶绿体、线粒体的 3.26 ~ 3.34 倍、3.55 ~ 3.82 倍; 叶片细胞溶质 H_2O_2 含量在高温胁迫后比对照明显增加, 而在 H_2O_2 预处理后又降低至对照水平, 叶绿体和线粒体 H_2O_2 含量在各处理下相对稳定, 始终与对照无显著差异。

从整体来看, 3 个杜鹃品种在各处理下叶片亚细胞组分 O_2^- 产生速率均相近, H_2O_2 含量始终表现为细胞溶质明显高于叶绿体和线粒体, 而后两者相近。高温胁迫后仅‘胭脂蜜’叶绿体以及‘红月’和‘红珊瑚’的细胞溶质中 O_2^- 产生速率显著提高, 而‘红月’和‘红珊瑚’在 H_2O_2 预处理后恢复至对照水平; 高温胁迫后 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分 H_2O_2 的含量均比对照不同程度提高, 而 H_2O_2 预处理后大多降至对照水平, 但‘胭脂蜜’细胞溶质以及‘红月’线粒体和细胞溶质的 H_2O_2 含量仍显著高于对照。

2.4 高温胁迫对杜鹃叶片亚细胞抗氧化酶活性的影响

SOD、POD、CAT 是植物体内清除活性氧的主要保护酶, SOD 催化超氧阴离子自由基 (O_2^-) 生成 O_2 和 H_2O_2 , 其 H_2O_2 则由 POD、CAT 清除^[10]。

2.4.1 SOD 活性 表 4 显示, 耐热品种‘胭脂蜜’和热敏感品种‘红珊瑚’叶片各亚细胞组分 SOD 活性在各处理条件下均表现为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 较耐热品种‘红月’则始终表现为细胞溶质 >

线粒体>叶绿体,且各品种细胞溶质均远高于叶绿体和线粒体组分,叶绿体和线粒体组分之间相近,除‘胭脂蜜’和‘红珊瑚’在 H₂O₂ 预处理+高温胁迫处理区叶绿体显著高于线粒体外,叶绿体和线粒体组分之间相近,差异不显著。在高温胁迫下,3 品种叶片各组分 SOD 活性均比对照不同程度增加,但仅‘红月’叶绿体和线粒体以及‘红珊瑚’的细胞溶质增幅达到显著水平;在 H₂O₂ 预处理+高温胁迫处理下,3 品种叶片各组分 SOD 活性比高温胁迫处理进一步提高,但均未达到显著水平,但它们与对照相比大多显著增加。可见,3 个杜鹃品种叶片亚细胞组分 SOD 活性在各处理下均以细胞溶质最高,而叶绿体和线粒体相近;高温胁迫下,较耐热和热敏感品种

个别组分 SOD 活性显著高于对照,而耐热品种 SOD 活性与对照差异不显著;3 个杜鹃 H₂O₂ 预处理+高温胁迫处理区各组分 SOD 活性虽比直接高温胁迫区略有提高,但增加都不显著,而且大多显著高于对照。

2.4.2 POD 活性 表 5 显示,耐热品种‘胭脂蜜’叶片各亚细胞组分 POD 活性在各处理条件下均始终表现为细胞溶质>叶绿体>线粒体,且细胞溶质显著高于叶绿体和线粒体,但叶绿体与线粒体间差异不显著;较耐热品种‘红月’则均始终表现为细胞溶质>线粒体>叶绿体,但在对照条件下,3 个亚细胞组分中 POD 活性差异都不显著;热敏感品种‘红珊瑚’在高温胁迫和 H₂O₂ 预处理后表现为细胞溶

表 3 高温胁迫及 H₂O₂ 预处理下 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分中 H₂O₂ 含量的变化

Table 3 H₂O₂ content in different sub-cellular fractions of three *Rhododendron* cultivars under heat stress and H₂O₂ pretreatment

品种 Cultivar	亚细胞组分 Sub-cellular fraction	H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content. (mmol/L)		
		对照 Control	高温胁迫 Heat stress	H ₂ O ₂ +高温胁迫 H ₂ O ₂ +Heat stress
胭脂蜜 Yanzhimi	叶绿体 Chloroplast	0.267±0.005b(b)	0.303±0.002a(b)	0.271±0.004b(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.258±0.002b(b)	0.282±0.008a(b)	0.260±0.005b(b)
	细胞溶质 Cytosol	1.052±0.016b(a)	1.124±0.017a(a)	1.154±0.023a(a)
红月 Hongyue	叶绿体 Chloroplast	0.255±0.009a(b)	0.268±0.003a(b)	0.257±0.007a(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.242±0.002c(b)	0.260±0.002a(b)	0.253±0.001b(b)
	细胞溶质 Cytosol	0.689±0.017c(a)	0.831±0.005a(a)	0.752±0.016b(a)
红珊瑚 Hongshanhu	叶绿体 Chloroplast	0.271±0.006a(b)	0.284±0.012a(b)	0.279±0.004a(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.250±0.003a(b)	0.263±0.004a(b)	0.256±0.006a(c)
	细胞溶质 Cytosol	0.906±0.013b(a)	1.005±0.007a(a)	0.910±0.002b(a)

表 4 高温胁迫及 H₂O₂ 预处理下 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分中 SOD 活性

Table 4 SOD activity in different sub-cellular fractions of three *Rhododendron* cultivars under heart stress and H₂O₂ pretreatment

品种 Cultivar	亚细胞组分 Sub-cellular fraction	SOD 活性 SOD activity (U/g)		
		对照 Control	高温胁迫 Heat stress	H ₂ O ₂ +高温胁迫 H ₂ O ₂ +Heat stress
胭脂蜜 Yanzhimi	叶绿体 Chloroplast	22.614±1.467b(b)	30.751±2.877ab(b)	33.881±1.142a(b)
	线粒体 Mitochondrion	21.675±0.614a(b)	24.370±1.633a(b)	25.783±2.015a(c)
	细胞溶质 Cytosol	106.808±0.135b(a)	110.955±3.007ab(a)	115.571±2.379a(a)
红月 Hongyue	叶绿体 Chloroplast	21.948±0.707b(b)	29.812±1.710a(b)	29.969±1.733a(b)
	线粒体 Mitochondrion	24.804±1.288b(b)	33.098±2.721a(b)	35.446±0.865a(b)
	细胞溶质 Cytosol	81.455±7.278b(a)	90.923±5.817ab(a)	106.182±6.596a(a)
红珊瑚 Hongshanhu	叶绿体 Chloroplast	23.044±1.223b(b)	27.895±2.715ab(b)	33.725±3.412a(c)
	线粒体 Mitochondrion	21.635±1.635a(b)	22.692±1.905a(b)	22.887±1.334a(b)
	细胞溶质 Cytosol	97.027±1.390b(a)	104.147±2.309a(a)	104.382±1.656a(a)

质>叶绿体>线粒体,但高温胁迫下细胞溶质与叶绿体之间差异不显著,但都显著高于线粒体,而在 H₂O₂ 预处理后细胞溶质中 POD 活性显著高于叶绿体和线粒体。‘红月’的细胞溶质和‘红珊瑚’的叶绿体组分 POD 活性在高温胁迫后均显著增加,而在 H₂O₂ 预处理后又均降低至对照水平,各品种叶片其余组分 POD 活性在高温胁迫后和 H₂O₂ 预处理后与对照相比均无显著变化。以上结果说明 3 个杜鹃品种叶片亚细胞组分 POD 活性始终以细胞溶质明显最高,高温胁迫下叶绿体 POD 活性在耐热和热敏感品种中高于线粒体,在较耐热品种中低于线粒体。在高温胁迫和 H₂O₂ 预处理后,除较耐热品种和热敏感品种个别组分 POD 活性先显著升高后降至对照外,其余品种各组分 POD 活性均无显著变化。

2.4.3 CAT 活性 表 6 显示,与 SOD 和 POD 活性相比,各品种亚细胞组分的 CAT 活性在各处理下的变化比较复杂。其中,耐热品种‘胭脂蜜’亚细胞组分 CAT 活性在对照条件下 3 个组分中活性差异不显著,在高温胁迫下表现为线粒体>细胞溶质>叶绿体,线粒体和细胞溶质相近,且显著高于叶绿体,在 H₂O₂ 预处理后表现为叶绿体>细胞溶质>线粒体,叶绿体和线粒体差异显著;叶片各组分除叶绿体外 CAT 活性在高温胁迫后显著提高,在 H₂O₂ 预处理后各组分 CAT 活性又不同程度提高,并显著高于对照。较耐热品种‘红月’叶片各亚细胞组分 CAT 活性在各处理条件下均始终表现为线粒体>细胞溶质>叶绿体,但仅在高温胁迫下各组分之间 CAT 活性差异显著;叶绿体 CAT 活性在高温胁迫

后下降但不显著,在 H₂O₂ 预处理后活性显著提高,线粒体和细胞溶质在高温胁迫后均比对照显著增加,在 H₂O₂ 预处理后 CAT 活性持续提高,并显著高于对照。热敏感品种‘红珊瑚’在对照条件下各亚细胞组分 CAT 活性表现为细胞溶质>叶绿体>线粒体,且各组分差异显著,在高温胁迫下 3 个组分之间 CAT 活性差异不显著,在 H₂O₂ 预处理后表现为线粒体显著高于叶绿体和细胞溶质;叶片叶绿体 CAT 活性在高温胁迫后比对照有所提高,在 H₂O₂ 预处理后活性有所下降,但变化均未达到显著水平;线粒体 CAT 活性在高温胁迫后提高但不显著,在 H₂O₂ 预处理后活性显著提高;细胞溶质 CAT 活性在高温胁迫后与对照相比显著下降,而在 H₂O₂ 预处理后 CAT 活性又有所提高,但与对照无显著差异。可见,耐热和较耐热杜鹃品种在对照条件下 3 个亚细胞组分中 CAT 活性差异不显著,高温胁迫后线粒体和细胞溶质中 CAT 活性显著高于叶绿体;而热敏感品种在高温胁迫差异变得不显著。H₂O₂ 处理后耐热杜鹃以叶绿体中含量最高,较耐热品种和热敏感品种则以线粒体中的 CAT 活性最高;高温处理后,‘红珊瑚’各组分 CAT 活性整体水平与对照差异不显著,‘胭脂蜜’和‘红月’的亚细胞组分 CAT 活性大多比对照显著增加;在 H₂O₂ 处理后,3 个杜鹃品种各组分 CAT 活性均比高温胁迫处理显著增加,且达到最大值。说明外源 H₂O₂ 能诱导叶片 CAT 活性增加,增强了 ROS 的清除能力,降低膜脂过氧化程度,对提高杜鹃幼苗的耐热能力起到重要作用。

表 5 高温胁迫及 H₂O₂ 预处理下 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分中 POD 活性

Table 5 POD activity in different sub-cellular fractions of three *Rhododendron* cultivars under heart stress and H₂O₂ pretreatment

品种 Cultivar	亚细胞组分 Sub-cellular fraction	POD 活性 POD activity (U/g)		
		对照 Control	高温胁迫 Heat stress	H ₂ O ₂ + 高温胁迫 H ₂ O ₂ + Heat stress
胭脂蜜 Yanzhimi	叶绿体 Chloroplast	14.509 ± 3.597a(b)	25.037 ± 5.278a(b)	17.364 ± 4.879a(b)
	线粒体 Mitochondrion	11.662 ± 2.075a(b)	21.070 ± 3.355a(b)	14.089 ± 2.696a(b)
	细胞溶质 Cytosol	35.997 ± 3.586a(a)	37.405 ± 1.897a(a)	36.965 ± 4.029a(a)
红月 Hongyue	叶绿体 Chloroplast	14.142 ± 5.622a(a)	24.736 ± 2.260a(b)	21.161 ± 5.404a(b)
	线粒体 Mitochondrion	16.225 ± 4.065a(a)	28.873 ± 2.086a(b)	22.265 ± 5.029a(b)
	细胞溶质 Cytosol	22.614 ± 4.136b(a)	54.280 ± 4.921a(a)	37.015 ± 6.098ab(a)
红珊瑚 Hongshanhu	叶绿体 Chloroplast	12.015 ± 2.588b(b)	35.766 ± 7.861a(a)	21.077 ± 3.676ab(b)
	线粒体 Mitochondrion	14.719 ± 3.332a(b)	22.963 ± 4.730a(b)	19.074 ± 3.577a(b)
	细胞溶质 Cytosol	34.932 ± 7.913a(a)	42.730 ± 14.823a(a)	37.661 ± 6.846a(a)

表 6 高温胁迫及 H₂O₂ 预处理下 3 个杜鹃品种叶片各亚细胞组分中 CAT 活性
Table 6 CAT activity in different sub-cellular fractions of three *Rhododendron* cultivars under heart stress and H₂O₂ pretreatment

品种 Cultivar	亚细胞组分 Sub-cellular fraction	CAT 活性 CAT activity (U/g)		
		对照 Control	高温胁迫 Heat stress	H ₂ O ₂ + 高温胁迫 H ₂ O ₂ + Heat stress
胭脂 Yanzhimi	叶绿体 Chloroplast	1.187 ± 0.387b(a)	1.477 ± 0.549b(b)	3.294 ± 0.009a(a)
	线粒体 Mitochondrion	1.423 ± 0.174b(a)	2.649 ± 0.328a(a)	2.690 ± 0.225a(b)
	细胞溶质 Cytosol	1.518 ± 0.079c(a)	2.429 ± 0.188b(a)	3.154 ± 0.110a(ab)
红月 Hongyue	叶绿体 Chloroplast	1.235 ± 0.118b(a)	0.561 ± 0.088b(c)	2.042 ± 0.354a(b)
	线粒体 Mitochondrion	1.533 ± 0.674b(a)	3.390 ± 0.173a(a)	3.897 ± 0.373a(a)
	细胞溶质 Cytosol	1.439 ± 0.148c(a)	2.100 ± 0.139b(b)	2.814 ± 0.136a(b)
红珊瑚 Hongshanhu	叶绿体 Chloroplast	1.821 ± 0.100a(b)	2.043 ± 0.114a(a)	1.836 ± 0.319a(b)
	线粒体 Mitochondrion	0.852 ± 0.060b(c)	1.677 ± 0.130b(a)	6.020 ± 0.455a(a)
	细胞溶质 Cytosol	3.011 ± 0.108a(a)	1.911 ± 0.388b(a)	2.683 ± 0.342ab(b)

3 结论与讨论

3.1 高温胁迫下杜鹃各亚细胞组分活性氧的产生与过氧化损伤

植物受到环境胁迫后 CO₂ 的固定受限、光呼吸途径的激活和光合反应中电子传递会受到抑制、电子传递链过度还原^[10,17], 活性氧过量积累。叶绿体、线粒体、过氧化物酶体和细胞膜是植物细胞活性氧产生的主要部位^[10]。在高温胁迫条件下, 本研究中 3 个杜鹃品种叶片 H₂O₂ 的亚细胞分布均为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 其中细胞溶质所占比较都在 60% 以上, 而 O₂⁻ 产生速率在 3 个杜鹃品种的各亚细胞的分布差异并不显著。高温胁迫下 MDA 亚细胞分布存在品种间差异, ‘胭脂蜜’ MDA 的亚细胞分布排序为细胞溶质 > 线粒体 > 叶绿体, 而耐热性较差的‘红珊瑚’和‘红月’MDA 亚细胞排序为细胞溶质 > 叶绿体 > 线粒体, 这说明不同杜鹃品种高温胁迫下各亚细胞所受的过氧化胁迫程度存在差异, 杜鹃细胞溶质所受的过氧化胁迫程度最重, 而热敏感杜鹃叶绿体受损比线粒体严重。高温胁迫下耐热性不同的杜鹃种, 其叶片解剖结构表现出不同程度的损伤, 主要表现在叶绿体、线粒体和细胞膜结构上, 其中叶绿体受损最为严重^[9]。细胞溶质作为细胞的主要流体部分, 是许多物质转运的必经场所, 因而在细胞感受由外界胁迫造成的氧化胁迫中起着重要的作用。于飞等^[8]发现低温胁迫下圆柏叶绿体中 MDA 含量最高, 推测其所受的过氧化胁迫程度最重, 其次是线粒体和细胞溶质, 这或许与胁迫类型或者植物基因型不同有关。

本研究中高温胁迫下各个杜鹃品种的 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 水平整体都有所提高, 其中‘胭脂蜜’各亚细胞器 H₂O₂ 水平都显著提高, 但高温胁迫下‘胭脂蜜’各亚细胞组分 MDA 水平与对照差异均不显著。说明高温胁迫下杜鹃叶片各亚细胞器活性氧的水平与其过氧化损伤程度并不直接相关。胁迫下积累的活性氧对抗性较弱的植株造成伤害, 对抗性强的植株活性氧的积累可以引起其防御系统的响应, 诱导提高抗性。有大量研究证明 H₂O₂ 积累有利于植物抗性增强^[13-15]。

3.2 高温胁迫下杜鹃各亚细胞组分抗氧化防御系统的响应机制

因胁迫类型的不同, 植物活性氧产生部位存在差异, 各亚细胞氧化胁迫的程度不同会导致不同抗氧化酶和抗氧化物质在亚细胞分布的差异。例如, 低温胁迫下圆柏叶绿体中 MDA 含量最高, 意味着其所受的过氧化胁迫程度最重, 其次是线粒体和细胞溶质^[8]。SOD 和抗坏血酸过氧化物酶(APX) 的活性在圆柏亚细胞中排序为叶绿体 > 细胞溶质 > 线粒体, CAT 活性为线粒体 > 叶绿体 > 细胞溶质。玉米叶片 SOD 活性在各细胞器中的分布以细胞溶质部分最高, 约占总活性的 85%, 叶绿体和线粒体部分各占 13% 和 2%^[18]。土壤淹水使玉米叶片各细胞器 SOD 活性下降, 叶绿体是受影响最敏感的亚细胞组分^[18]。大豆在盐胁迫下 SOD 活性分布为细胞溶质(80%) > 线粒体(11%) > 叶绿体(9%)^[19]。本研究中, 高温胁迫下杜鹃各亚细胞器活性氧水平存在差异, 各亚细胞所受的氧化胁迫程度的不同也导致不同抗氧化酶在亚细胞分布的差异。而同种抗氧

化酶在高温胁迫下的亚细胞定位也存在种(或品种)间差异。其中,高温胁迫后叶片亚细胞组分 SOD 和 POD 活性在‘胭脂蜜’和‘红珊瑚’中排序为细胞溶质>叶绿体>线粒体,在‘红月’中排序为细胞溶质>线粒体>叶绿体。据报道低温胁迫下祁连圆柏和圆柏 POD 活性的亚细胞分布也存在种间差异^[8]。

抗氧化酶基因的表达与否与各亚细胞组分活性氧积累和所受的氧化胁迫程度有关。研究表明,线粒体中活性氧的积累诱导 Mn-SOD 基因的表达;叶绿体活性氧水平的提高则诱导 Fe-SOD 基因的表达,而细胞质中 ROS 的积累上调细胞质型 Cu/Zn-SOD 基因的表达^[20]。本研究中 3 个杜鹃品种 SOD 活性都以细胞溶质最高,这应该与细胞溶质中较高的 H₂O₂ 水平有关,也说明 Cu/Zn-SOD 基因在杜鹃耐热性中起着重要作用。CAT 主要存在于过氧化物酶体中,但也存在于细胞溶质、线粒体以及叶绿体中^[10]。CAT 基因家族主要有 3 种类型,CAT1 和 CAT2 主要位于过氧化物酶体和细胞溶质中,而 CAT3 主要在线粒体中表达。本研究中,高温胁迫下‘胭脂蜜’和‘红月’CAT 活性都以线粒体为最高,其次是细胞溶质和叶绿体,而热敏感品种‘红珊瑚’则以叶绿体中 CAT 活性最高,其次是细胞溶质和线粒体,这说明在耐热性不同的杜鹃幼苗中起主要作用的 CAT 基因类型可能不同。

3.3 H₂O₂ 预处理所诱导的杜鹃耐热性机制

从整体水平来看,H₂O₂ 预处理减轻了高温胁迫下杜鹃幼苗叶片的受伤害程度及活性氧和 MDA 的积累量,尤其是对耐热性较差的‘红月’和‘红珊瑚’的效果尤为显著。有研究表明,在低温胁迫下,适宜浓度的外源 H₂O₂ 预处理降低了水稻幼苗萎蔫程度,同时还抑制了 MDA 的含量,但未降低活性氧

水平^[21]。从亚细胞水平来看,本试验中 H₂O₂ 预处理对杜鹃叶片各亚细胞器的活性氧水平的影响也表现出品种间差异。其中,H₂O₂ 预处理有效抑制了‘胭脂蜜’、‘红月’2 个杜鹃品种中线粒体和细胞溶质中 H₂O₂ 积累,降低了‘红珊瑚’细胞溶质中的 H₂O₂ 水平;但仅‘红珊瑚’细胞溶质中 O₂⁻ 产生速率在 H₂O₂ 预处理下出现明显下降,其他各个品种亚细胞器中 O₂⁻ 产生速率变化不显著;H₂O₂ 预处理仅对‘红月’叶绿体所受的过氧化损伤减轻效果显著。这些结果暗示减轻杜鹃幼苗叶绿体过氧化损伤对减轻植物的高温胁迫症状是非常重要的。

与直接高温胁迫处理区相比,H₂O₂ 预处理提高 3 个杜鹃品种亚细胞组分 SOD、CAT 活性,但其 POD 活性虽有所降低但仍高于对照。在其他植物抗性研究中也有类似报道,适宜浓度的外源 H₂O₂ 处理通过抗氧化系统的调节,提高了水稻^[22]、菊苣^[23]的耐盐性,黄瓜的耐旱性^[24],香蕉的耐寒性^[12]。另外,H₂O₂ 所诱导的植物抗性与脱水蛋白和热激蛋白基因的高表达^[23]以及其他抗性信号的传导有关^[15,25],有研究表明,在一定的浓度范围内,H₂O₂ 作为信号分子通过参与多种信号转导途径调节相关的基因表达以及生理代谢过程,其中调节抗氧化酶基因是提高植物抗逆性的一种重要手段,H₂O₂ 诱导了干旱、高温及干旱高温复合胁迫下玉米叶片中的 4 个抗氧化防护酶基因表达^[26]。因此,逆境胁迫下细胞内 H₂O₂ 具有双重作用,维持 H₂O₂ 的动态平衡是植物适宜逆境能力的一种表现,控制在适宜水平的活性氧可以作为信号分子诱导蛋白激酶和 ABA 等逆境信号分子及逆境应答相关的基因和蛋白的表达,调控植物生长发育,响应各种逆境胁迫。

参考文献:

- [1] 耿玉英. 中国杜鹃花属植物[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2014: 612.
- [2] 耿兴敏,胡才民,杨秋玉,等. 杜鹃花对各种非生物逆境胁迫的抗性研究进展[J]. 中国野生植物资源,2014,33(3): 18-21. GENG X M, HU C M, YANG Q Y, et al. Research advance of resistance to abiotic stresses of *Rhododendrons*[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2014, 33(3): 18-21.
- [3] 张乐华,孙宝腾,周广,等. 高温胁迫下五种杜鹃花属植物的生理变化及其耐热性比较[J]. 广西植物,2011,31(5): 651-658. ZHANG L H, SUN B T, ZHOU G, et al. Physiological changed and heat tolerance comparison of five *Rhododendrons* species under high-temperature stress[J]. *Guihaia*, 2011, 31(5): 651-658.
- [4] 张乐华,周广,孙宝腾,等. 高温胁迫对两种常绿杜鹃亚属植物幼苗生理生化特性的影响[J]. 植物科学学报,2011, 29(3): 362-369. ZHANG L H, ZHOU G, SUN B T, et al. Physiological and biochemical effects of high temperature stress on the seedlings of two *Rhododendron* species of subgenus *hymenanthus*[J]. *Plant Science Journal*, 2011, 29(3): 362-369.
- [5] SHEN H F, ZHAO B, XU J J, et al. Effects of heat stress on changes in physiology and anatomy in two cultivars of *Rhododendron*[J]. *South African Journal of Botany*, 2017, 112: 338-345.
- [6] 李小玲,雒玲玲,华智锐. 高温胁迫下高山杜鹃的生理生化响

- 应[J]. 西北农业学报, 2018, **27**(2): 1-6.
- LI X L, LUO L L, HUA Z R. Physiological and biochemical responses of alpine *Rhododendrons* under high temperature stress [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2018, **27**(2): 1-6.
- [7] SLESÁK I, LIBÍK M, KARPINSKA B, *et al.* The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses[J]. *Acta Biochim Pol*, 2007, **54**(1): 39-50.
- [8] 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.
- YU F, CHEN Y P, YANG Z J, *et al.* Effect of low temperature stress on antioxidant enzymes activities in the subcellular of two *Sabina* species[J]. *Guihaia*, 2014, **34**(5): 686-693.
- [9] GU K, GENG X M, YUE Y, *et al.* Contribution of keeping more stable anatomical structure under high temperature to heat resistance of *Rhododendron* seedlings[J]. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 2016, **61**(2): 273-279.
- [10] DAS K, ROYCHOUDHURY A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants [J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2014, **2**(53): 1-13.
- [11] PEREZ B I, BROWN P. The role of ROS signaling in cross-tolerance: from model to crop[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 1-6.
- [12] 余土元, 冯颖竹. 低温对香蕉幼苗的伤害及外源 H₂O₂、CaCl₂ 对香蕉抗寒性的影响[J]. 中国农学通报, 2011, **27**(25): 219-223.
- YU S Y, FENG Y Z. Low-temperature injury of banana seedlings and effects of exogenous H₂O₂ and CaCl₂ on cold resistance in banana[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, **27**(25): 219-223.
- [13] GONG M, CHEN B, LI Z G, *et al.* Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂ [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, **158**(9): 1 125-1 130.
- [14] LUNA C M, PASTORI G M, DRISCOLL S, *et al.* Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **56**(411): 417-423.
- [15] LI H, LIU S S, YI C Y, *et al.* Hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced HSP70 accumulation and heat tolerance in grafted cucumber plants[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2014, **37**(12): 2 768-2 780.
- [16] ZANDALINAS S I, BALFAGON D, AROBONA V, *et al.* Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in *Citrus* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**(953): 1-10.
- [17] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plant[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, **9**(10): 490-498.
- [18] 李建坤, 汪宗立. 涝渍逆境下玉米叶片各细胞器超氧化物歧化酶活性的变化及 6-BA 的保护作用[J]. 江苏农业学报, 1992, **8**(3): 20-24.
- LI J K, WANG Z L. Changes in the activity of superoxide dismutase in various organelles of maize leaves under water-logging stress and the protective effect of 6-BA[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 1992, **8**(3): 20-24.
- [19] 陈一舞, 邵桂花, 常汝镇. 盐胁迫对大豆幼苗子叶各细胞器超氧化物歧化酶(SOD)的影响[J]. 作物学报, 1997, **23**(2): 214-219.
- CHEN Y W, SHAO G H, CHANG R Z. Effect of salt stress on superoxide dismutase (SOD) in cotyledon of soybean seedling[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1997, **23**(2): 214-219.
- [20] BOWLER C, MONTAGU M, INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1992, **43**: 83-116.
- [21] 韩娜, 冯汉青, 李燕鸿, 等. 外源 H₂O₂ 对水稻幼苗抗寒性的调节作用[J]. 西北植物学报, 2009, **29**(6): 1 214-1 219.
- HAN N, FENG H Q, LI Y H, *et al.* Regulation of exogenous H₂O₂ on rice seedlings chilling tolerance[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, **29**(6): 1 214-1 219.
- [22] 徐芬芬, 徐鹏, 胡志涛, 等. 外源过氧化氢对盐胁迫下水稻幼苗根系生长和抗氧化系统的影响[J]. 杂交水稻, 2017, **32**(1): 74-77.
- XU F F, XU P, HU Z T, *et al.* Effects of exogenous hydrogen peroxide on root growth and antioxidant system of rice seedling under salt stress[J]. *Hybrid Rice*, 2017, **32**(1): 74-77.
- [23] GU W Y, MO P H, YANG J S, *et al.* Exogenous nitric oxide and hydrogen peroxide regulate the acclimation of chicory (*Cichorium intybus*) to salt stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, **33**(1): 89-97.
- [24] 刘忠静, 郭延奎, 林少航, 等. 外源过氧化氢对干旱胁迫下温室黄瓜叶绿体超微结构和抗氧化酶的影响[J]. 园艺学报, 2009, **36**(8): 1 140-1 146.
- LIU Z J, GONG Y K, LIN S H, *et al.* Effects of exogenous hydrogen peroxide on ultrastructure of chloroplast and activities of antioxidant enzyme in greenhouse cucumber under drought stress[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, **36**(8): 1 140-1 146.
- [25] ZHOU J, XIA X J, ZHOU Y H, *et al.* RBOH1-dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(2): 595-607.
- [26] 王瑛, 杨海荣, 张莉, 等. H₂O₂ 和 ABA 对干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护基因表达的影响[J]. 河南农业大学学报, 2011, **45**(6): 634-639.
- WANG Y, YANG H R, ZHANG L, *et al.* Influence of H₂O₂ and ABA on antioxidant defense gene expression of maize seedlings leaves under the combination of drought and heat stress[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2011, **45**(6): 634-639.