

## · 中药资源研究 ·

# $\gamma$ -氨基丁酸对怀玉山三叶青低温胁迫下试管苗生长及相关生理代谢的影响

洪森荣<sup>1,2,3,4</sup>, 余媛媛<sup>1</sup>, 彭睿羚<sup>1</sup>, 刘雯莉<sup>1</sup>, 胡滕鑫<sup>1</sup>, 王玉婷<sup>1</sup> (1. 上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001; 2. 上饶农业技术创新研究院, 江西 上饶 334001; 3. 上饶市药食同源植物资源保护与利用重点实验室, 江西 上饶 334001; 4. 上饶市三叶青保育与利用技术创新中心, 江西 上饶 334001)

**摘要:** 目的 探讨  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)对怀玉山三叶青低温胁迫下试管苗生长及相关生理代谢的影响, 为其在怀玉山三叶青仿野生栽培中的防冻抗寒应用提供依据。方法 以低温胁迫下 GABA 处理的怀玉山三叶青试管苗为研究对象, 采用植物组织培养法测定其生长指标, 植物生理生化法测定其生理指标, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测其查尔酮合酶和黄酮醇合酶基因的相对表达量。结果 与未添加 GABA 的对照组相比, 培养基中添加  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA, 怀玉山三叶青 2 个栽培种“怀玉 1 号”和“怀玉 2 号”试管苗的增殖系数、株高、鲜质量、干质量及组织含水量均达到最高值; 可以显著提高其可溶性蛋白(SP)、可溶性糖(SS)、脯氨酸(Pro)、还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)、吲哚乙酸(IAA)、玉米素核苷(ZR)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)、茉莉酸(JA)的含量, 以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)的活性和查尔酮合酶(*CHS*)基因的相对表达量(RQ 值); 显著降低其相对电导率、脱落酸(ABA)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、丙二醛(MDA)的含量, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>产生速率, 以及黄酮醇合酶(*FLS*)基因的相对表达量。低温胁迫下 GABA 处理的怀玉山三叶青试管苗的生长与 IAA、ZR、GA<sub>3</sub>、JA、SS、AsA、GSH 的含量和 *CHS* 基因表达呈正相关。结论 适当浓度的 GABA 可以调控内源植物激素和渗透调节物质含量、抗氧化物质含量以及次生代谢物关键基因表达, 以促进低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长。

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸; 怀玉山三叶青; 低温胁迫; 试管苗; 生长; 生理代谢

**中图分类号:** R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2024)01-0132-09

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2024.01.015

## Effects of $\gamma$ -Aminobutyric Acid on the Growth and Related Physiological Metabolism of Plantlets of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg From Huaiyu Mountain Under Low Temperature Stress

HONG Senrong<sup>1,2,3,4</sup>, YU Huanyuan<sup>1</sup>, PENG Ruiling<sup>1</sup>, LIU Wenli<sup>1</sup>, HU Tengxin<sup>1</sup>, WANG Yuting<sup>1</sup> (1. College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001 Jiangxi, China; 2. Shangrao Agricultural Technology Innovation Research Institute, Shangrao 334001 Jiangxi, China; 3. Key Laboratory of Protection and Utilization of Medicinal and Edible Plant Resources in Shangrao City, Shangrao 334001 Jiangxi, China; 4. Shangrao *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg Conservation and Utilization Technology Innovation Center, Shangrao 334001 Jiangxi, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on the growth and related physiological metabolism of plantlets of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature

收稿日期: 2023-08-28

作者简介: 洪森荣, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 药用植物生物技术。Email: hongsenrong@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31960079); 2022 年上饶市科技专项项目(饶科发[2023]5 号社发类, 2022A008); 江西省科技厅重点研发计划一般项目(20202BBG73010); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ201704); 上饶市科技局平台载体建设项目(2020J001); 上饶师范学院 2023 年大学生创新创业训练计划项目(2023-PX-17)。

stress, which provides a basis for its application of anti-freezing and cold resistance in the wild-imitation cultivation of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu mountain. **Methods** Plantlets of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain, which were treated with GABA under low temperature stress, were selected as research objects. The growth indicators, physiological indexes, the relative expression levels of chalcone synthase and flavonol synthase genes were measured using plant tissue culture, physiological and biochemical methods and qRT-PCR, respectively. **Results** Compared with the control group without GABA, the proliferation coefficient, plant height, fresh weight, dry weight, and tissue water content of the two cultivated plantlets of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain ( “Huaiyu 1” and “Huaiyu 2” ) reach their maximum value when  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA was added to the culture medium. Moreover, content of soluble protein (SP), soluble sugar (SS), proline (Pro), reduced glutathione (GSH), ascorbic acid (AsA), indole acetic acid (IAA), zeatin nucleoside (ZR), gibberellin ( $\text{GA}_3$ ), jasmonic acid (JA), the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), ascorbic acid peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), and the relative expression level (RQ value) of chalcone synthase (*CHS*) gene were significantly increased. Moreover, relative conductivity, content of abscisic acid (ABA), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), malondialdehyde (MDA), rate of  $\text{O}_2 \cdot^-$  production, and relative expression levels (RQ value) of flavonol synthase (*FLS*) gene were obviously decreased. The growth of plantlets of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain, which were treated with GABA under low temperature stress, was positively correlated with the contents of IAA, ZR,  $\text{GA}_3$ , JA, SS, AsA, GSH, and the expression of *CHS* genes. **Conclusion** Appropriate concentration of GABA can regulate the contents of endogenous plant hormones and osmoregulation substances, antioxidant substances, and the expression of key genes in secondary metabolites, so as to promote the growth of plantlets of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress.

**Keywords:**  $\gamma$ -Aminobutyric acid; *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain; low temperature stress; plantlet; growth; physiological metabolism

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)为葡萄科(Vitaceae)崖爬藤属(*Tetrastigma*)植物, 学名三叶崖爬藤, 味苦、辛, 性平或凉, 归心、肺、肝、肾经, 以块根或全草入药, 有“植物抗生素”“抗癌神草”等美誉, 为民间珍稀中草药<sup>[1]</sup>, 始载于清代植物学专家吴其濬的《植物名实图考》。三叶青常用于治疗高热惊厥、肺炎、哮喘、肝炎、风湿、月经不调、咽痛、瘰疬等症, 具有抗炎镇痛、抗肝损伤、免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、降血糖等作用, 临床上多用于各种炎症、病毒感染和癌症的治疗<sup>[2]</sup>。怀玉山三叶青主要分布在以怀玉山山脉为中心的赣、浙、皖、闽相交的高山山区, 其茎叶含有牡荆素鼠李糖苷、异牡荆素鼠李糖苷、异牡荆素和牡荆素等抗癌活性成分, 块根的黄酮类成分有山奈酚芸香糖苷、芦丁、异槲皮苷、儿茶素、紫云英苷等<sup>[3]</sup>。怀玉山三叶青具有抑制癌细胞增殖、促进癌细胞凋亡等作用, 可作为癌症防治的功能性食品<sup>[4-8]</sup>。2016年3月31日, 原中华人民共和国农业部正式批准对“怀玉山三叶

青”实施农产品地理标志登记保护<sup>[9]</sup>。随着怀玉山三叶青用途和应用领域的扩大, 由于过度采挖导致怀玉山三叶青野生资源蕴藏量急剧下降, 面临枯竭<sup>[10]</sup>。2018年3月, 怀玉山三叶青被江西省森林药材与食品研究所推荐为“适宜林下套种栽培的中药材品种”<sup>[11]</sup>。在低产经济林或毛竹林下套种怀玉山三叶青, 既可以充分利用生态资源, 发展林下经济; 同时对于发展绿色无公害药用植物种植、促进生态农业可持续发展具有重要意义。但有研究<sup>[11]</sup>表明, 在海拔800 m以上区域的怀玉山三叶青, 冬季地上部分会冻坏, 甚至整株死亡, 且越往海拔高的地方, 植株冻死的比例越大。如何抗低温胁迫是怀玉山三叶青仿野生栽培需要迫切需要解决的问题。 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是一种四碳非蛋白质氨基酸的植物分子信号<sup>[12]</sup>, 可调节细胞内外环境酸碱度, 维持碳氮营养平衡, 参与植物对逆境胁迫的响应<sup>[13-14]</sup>。已有研究证实, 外源GABA处理能减轻桃<sup>[15-16]</sup>、香蕉<sup>[17]</sup>和苹果<sup>[18]</sup>等果实采后低温冷害的发生,

增强油菜<sup>[19]</sup>、粳稻<sup>[20]</sup>和黄瓜<sup>[21]</sup>等幼苗的低温抗性。本研究以怀玉山三叶青2个栽培种“怀玉1号”和“怀玉2号”试管苗为材料,观察继代培养时培养基中添加GABA对低温胁迫下试管苗生长及相关生理代谢的影响,以明确GABA在怀玉山三叶青组织培养中的作用,为怀玉山三叶青试管苗的高效、高质量繁育提供技术指导,并为GABA在怀玉山三叶青仿野生栽培中的防冻抗寒应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 怀玉山三叶青2个栽培种“怀玉1号”和“怀玉2号”试管苗由上饶市三叶青保育与利用技术创新中心提供,经上饶市红日农业开发有限公司陈荣华高级农艺师鉴定为葡萄科(Vitaceae)崖爬藤属(Tetrastigma)植物三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)。

### 1.2 方法

**1.2.1 怀玉山三叶青试管苗生长指标的测定** 取继代培养的试管苗,切取其1.5 cm的带芽茎段,转接到添加了GABA的培养基上。培养基设置为基本培养基(MS)+1 mg·L<sup>-1</sup> 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 萘乙酸(NAA)+0~0.7 g·L<sup>-1</sup> GABA+30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+7.5 g·L<sup>-1</sup> 琼脂(pH 5.8)<sup>[22]</sup>。每种培养基设置为3次重复,每次重复接种25个茎段,放入光照培养箱培养。光照培养箱的培养条件为:光照强度30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间14 h·d<sup>-1</sup>,温度(5±1)°C。培养2个月后,测定2个试管苗的增殖系数(MC)(增殖系数=新增芽数/接种茎段数)、株高(PH, cm)、鲜质量(FM, mg)和干质量(DM, mg),并计算试管苗的组织含水量(TWC, %)[(鲜质量-干质量)/鲜质量×100%]<sup>[22]</sup>。

**1.2.2 怀玉山三叶青试管苗生理指标的测定** 根据“1.2.1”项下实验结果,筛选有效促进低温试管苗生长的较佳GABA浓度,以此浓度GABA处理的试管苗为处理组,以蒸馏水(即0 g·L<sup>-1</sup> GABA)处理的试管苗为对照组,处理组和对照组均置于低温(5±1)°C下进行培养试验。培养至60 d时分别取试管苗测定相关生理指标。内源激素[吲哚乙酸(IAA)、玉米素核苷(ZR)、赤霉素<sub>3</sub>(GA<sub>3</sub>)、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)]的含量采用岛津超高效液相色谱仪(LC-30AT)连接SCIEX 5600+质谱仪测定<sup>[23]</sup>;MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定<sup>[24]</sup>;可溶性糖(SS)含量采用蒽酮比色法测定<sup>[25]</sup>;脯氨酸(Pro)含量采用茚三酮比色法测定<sup>[26]</sup>;可

溶性蛋白(SP)含量采用考马斯亮蓝G-520法<sup>[25]</sup>测定;超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)产生速率采用羟胺氧化法<sup>[27]</sup>测定;过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量采用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定;还原型谷胱甘肽(GSH)含量采用HPLC法<sup>[28]</sup>测定;抗坏血酸(AsA)含量采用Kampfenkel等<sup>[29]</sup>的Fe<sup>3+</sup>还原法测定;超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑光还原法<sup>[30]</sup>测定;过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚比色法<sup>[31]</sup>测定;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性采用黄真池等<sup>[32]</sup>的方法测定;谷胱甘肽还原酶(GR)活性采用李慧等<sup>[33]</sup>的方法测定。所有指标均重复3次。

**1.2.3 怀玉山三叶青试管苗查尔酮合酶和黄酮醇合酶基因的实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测** 按“1.2.2”项下方法分组及培养三叶青试管苗。培养至60 d时依据植物RNA提取试剂盒(Omega)说明书分别提取怀玉1号和怀玉2号试管苗的总RNA。参考林国卫等<sup>[34]</sup>的方法,验证总RNA的完整性、含量和纯度。采用SuperRT cDNA第一链合成试剂盒(CWBIO),按照说明书要求合成反转录cDNA第一链。参考本实验室<sup>[35]</sup>的方法,设计基因引物。查尔酮合酶(*CHS*)基因的引物为:(正向引物F)5' CACGAG TCCCACCTCGACTC3';(反向引物R)5' AGGGGACG CTCCACGGACA3',黄酮醇合酶(*FLS*)基因的引物为:(F)5' ATATGTACCCACCATGCCCA3';(R)5' CGGCGATCCAGTTATCGTCTT3',以GAPDH为内参基因,进行qRT-PCR检测。

**1.2.4 数据统计与分析** 采用Microsoft Excel 2010录入、整理和统计数据,结果数据用“均数±标准差”表示。运用SPSS 24.0统计软件进行分析,采用LSD法进行数据间的多重比较,并运用Duncan's法进行差异显著性检验和Pearson相关性分析。采用Microsoft Excel 2010进行绘图。

## 2 结果与分析

**2.1 GABA对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗生长和组织含水量的影响** GABA对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗增殖倍数、株高、鲜质量及干质量的影响见表1。添加不同浓度的GABA(0.1~0.7 g·L<sup>-1</sup>)可以显著促进低温胁迫下试管苗增殖系数、株高、鲜质量及干质量的增加。其中,0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA的促进效应最好。与未添加GABA的对照组相比,0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA处理组试管苗的增殖系数、株高、鲜质量及干质量均达到最高值。与对照组比较,怀玉1号和怀玉



表 1 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗生长和组织含水量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of GABA on the growth and tissue water content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress( $\bar{x} \pm s$ )

| GABA 浓度<br>( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 增殖系数                   |                        | 株高/cm                  |                        | 鲜质量/mg                  |                         | 干质量/mg                  |                         | 组织含水量/%                 |                         |
|-----------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                               | 怀玉 1 号                 | 怀玉 2 号                 | 怀玉 1 号                 | 怀玉 2 号                 | 怀玉 1 号                  | 怀玉 2 号                  | 怀玉 1 号                  | 怀玉 2 号                  | 怀玉 1 号                  | 怀玉 2 号                  |
| 0                                             | 1.8 ± 0.2 <sup>c</sup> | 1.9 ± 0.6 <sup>c</sup> | 2.3 ± 0.3 <sup>c</sup> | 2.6 ± 0.5 <sup>d</sup> | 36.3 ± 4.2 <sup>c</sup> | 38.7 ± 6.5 <sup>d</sup> | 8.7 ± 1.2 <sup>c</sup>  | 8.9 ± 2.1 <sup>c</sup>  | 76.3 ± 5.6 <sup>c</sup> | 77.0 ± 8.2 <sup>d</sup> |
| 0.1                                           | 2.1 ± 0.4 <sup>c</sup> | 2.2 ± 0.5 <sup>b</sup> | 3.4 ± 0.8 <sup>d</sup> | 4.6 ± 0.3 <sup>c</sup> | 41.6 ± 6.2 <sup>d</sup> | 58.3 ± 7.3 <sup>c</sup> | 8.6 ± 2.5 <sup>c</sup>  | 10.7 ± 1.8 <sup>b</sup> | 79.3 ± 4.9 <sup>b</sup> | 81.7 ± 4.3 <sup>c</sup> |
| 0.3                                           | 2.8 ± 0.3 <sup>b</sup> | 3.5 ± 0.3 <sup>a</sup> | 5.2 ± 1.2 <sup>b</sup> | 6.5 ± 0.7 <sup>b</sup> | 57.3 ± 3.5 <sup>b</sup> | 76.6 ± 4.5 <sup>b</sup> | 10.3 ± 1.1 <sup>b</sup> | 12.8 ± 2.2 <sup>a</sup> | 82.2 ± 3.3 <sup>a</sup> | 82.8 ± 6.2 <sup>b</sup> |
| 0.5                                           | 3.2 ± 0.6 <sup>a</sup> | 3.6 ± 0.5 <sup>a</sup> | 6.8 ± 0.9 <sup>a</sup> | 8.8 ± 0.4 <sup>a</sup> | 70.4 ± 8.8 <sup>a</sup> | 86.4 ± 3.8 <sup>a</sup> | 12.6 ± 3.2 <sup>a</sup> | 12.9 ± 3.1 <sup>a</sup> | 82.1 ± 7.2 <sup>a</sup> | 85.1 ± 3.9 <sup>a</sup> |
| 0.7                                           | 2.2 ± 0.5 <sup>c</sup> | 2.3 ± 0.8 <sup>b</sup> | 4.5 ± 0.7 <sup>c</sup> | 6.8 ± 0.3 <sup>b</sup> | 50.3 ± 5.2 <sup>c</sup> | 74.5 ± 2.9 <sup>b</sup> | 9.9 ± 2.8 <sup>b</sup>  | 12.3 ± 2.4 <sup>a</sup> | 80.3 ± 6.1 <sup>b</sup> | 83.5 ± 5.9 <sup>b</sup> |

注：相同指标不同小写字母表示两组间差异有显著性( $P < 0.05$ )

2号试管苗的增殖系数分别增加 1.77、1.89 倍，株高分别增加 2.96、3.38 倍，鲜质量分别增加 1.88、2.28 倍，干质量分别增加 2.33、3.39 倍。不同浓度(0.1~0.7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 GABA 可以显著增加低温胁迫下怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗组织含水量。与对照组相比，0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA 处理组怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗组织含水量均达到最高值，分别是对照组的 1.08 倍和 1.10 倍。

**2.2 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗渗透调节物质含量的影响** 结果见表 2。添加 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA 可以显著增加低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸的含量。与对照组相比，培养基中添加 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA，怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗可溶性蛋白含量分别增加 47.66% 和 69.99%，可溶性糖含量分别增加 46.76% 和 46.79%，脯氨酸含量分别增加 47.47% 和 56.41%。

表 2 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗渗透调节物质含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Table 2 Effect of GABA on the content of osmotic regulating substances in *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| GABA 浓度<br>( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 可溶性蛋白                      |                            | 可溶性糖                       |                            | 脯氨酸                        |                            |
|-----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                               | 怀玉 1 号                     | 怀玉 2 号                     | 怀玉 1 号                     | 怀玉 2 号                     | 怀玉 1 号                     | 怀玉 2 号                     |
| 0                                             | 1.349 ± 0.134 <sup>b</sup> | 1.683 ± 0.454 <sup>b</sup> | 3.582 ± 0.675 <sup>b</sup> | 4.268 ± 0.272 <sup>b</sup> | 0.375 ± 0.083 <sup>b</sup> | 0.562 ± 0.129 <sup>b</sup> |
| 0.5                                           | 1.986 ± 0.256 <sup>a</sup> | 2.861 ± 0.652 <sup>a</sup> | 5.257 ± 0.872 <sup>a</sup> | 6.265 ± 0.429 <sup>a</sup> | 0.553 ± 0.182 <sup>a</sup> | 0.879 ± 0.092 <sup>a</sup> |

注：相同指标不同小写字母表示两组间差异有显著性( $P < 0.05$ )

**2.3 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗活性氧(ROS)含量及膜脂过氧化的影响** 结果见表 3。添加 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA 可以显著降低低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的相对电导率、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量、MDA 含量和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  产生速率。与对照组相比，培养基中添加 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA，怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗相对电导率分别降低 32.96% 和 31.69%， $\text{H}_2\text{O}_2$  含量分别降低 35.46% 和 35.58%，MDA 含量分别降低 22.24% 和 28.87%， $\text{O}_2^{\cdot-}$

产生速率分别降低 33.44% 和 30.63%。

**2.4 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗抗氧化物质含量及抗氧化酶活性的影响** 结果见表 4。添加 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA 可以显著提高低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的 GSH、AsA 含量及 SOD、POD、APX、GR 活性。与对照组相比，培养基中添加 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  GABA，怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗 GSH 含量分别提高 84.67% 和 72.52%，AsA 含量分别提高 81.48% 和

表 3 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗活性氧含量及膜脂过氧化的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of GABA on the content of ROS content and membrane lipid peroxidation in *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress( $\bar{x} \pm s$ )

| GABA 浓度/<br>( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 相对电导率/%                   |                           | $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1})$ |                           | MDA/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$ |                           | $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ |                           |
|------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|                                                | 怀玉 1 号                    | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                                                   | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                                     | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                                                                                  | 怀玉 2 号                    |
| 0                                              | 24.38 ± 2.23 <sup>a</sup> | 18.24 ± 1.89 <sup>a</sup> | 36.18 ± 4.55 <sup>a</sup>                                | 31.25 ± 3.18 <sup>a</sup> | 46.27 ± 7.23 <sup>a</sup>                  | 42.15 ± 4.45 <sup>a</sup> | 18.57 ± 2.14 <sup>a</sup>                                                               | 16.29 ± 2.84 <sup>a</sup> |
| 0.5                                            | 16.25 ± 1.56 <sup>b</sup> | 12.46 ± 1.13 <sup>b</sup> | 23.35 ± 2.78 <sup>b</sup>                                | 20.13 ± 1.87 <sup>b</sup> | 35.98 ± 4.19 <sup>b</sup>                  | 29.98 ± 3.26 <sup>b</sup> | 12.36 ± 1.28 <sup>b</sup>                                                               | 11.28 ± 1.69 <sup>b</sup> |

注：相同指标不同小写字母表示两组间差异有显著性( $P < 0.05$ )

表 4 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗抗氧化物质含量及抗氧化酶活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of GABA on the antioxidant content and antioxidant enzyme activity in *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress ( $\bar{x} \pm s$ )

| GABA 浓度<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | GSH/(μmol·g <sup>-1</sup> ) |                             | AsA/(μg·g <sup>-1</sup> )   |                             | SOD 活性/(U·g <sup>-1</sup> ) |                             |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                 | 怀玉 1 号                      | 怀玉 2 号                      | 怀玉 1 号                      | 怀玉 2 号                      | 怀玉 1 号                      | 怀玉 2 号                      |
| 0                               | 126.78 ± 23.65 <sup>b</sup> | 167.83 ± 34.55 <sup>b</sup> | 254.65 ± 36.28 <sup>b</sup> | 268.94 ± 57.86 <sup>b</sup> | 146.45 ± 18.57 <sup>b</sup> | 168.93 ± 18.35 <sup>b</sup> |
| 0.5                             | 238.11 ± 36.28 <sup>a</sup> | 289.54 ± 26.82 <sup>a</sup> | 462.15 ± 39.05 <sup>a</sup> | 512.64 ± 76.23 <sup>a</sup> | 180.58 ± 32.88 <sup>a</sup> | 238.19 ± 32.16 <sup>a</sup> |
| GABA 浓度<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | POD 活性/(U·g <sup>-1</sup> ) |                             | APX 活性/(U·g <sup>-1</sup> ) |                             | GR 活性/(U·g <sup>-1</sup> )  |                             |
|                                 | 怀玉 1 号                      | 怀玉 2 号                      | 怀玉 1 号                      | 怀玉 2 号                      | 怀玉 1 号                      | 怀玉 2 号                      |
| 0                               | 42.86 ± 8.57 <sup>b</sup>   | 54.61 ± 8.14 <sup>b</sup>   | 3.88 ± 1.53 <sup>b</sup>    | 5.63 ± 1.24 <sup>b</sup>    | 23.25 ± 2.28 <sup>b</sup>   | 29.48 ± 6.15 <sup>b</sup>   |
| 0.5                             | 66.94 ± 12.41 <sup>a</sup>  | 98.25 ± 12.67 <sup>a</sup>  | 6.25 ± 1.34 <sup>a</sup>    | 9.24 ± 2.38 <sup>a</sup>    | 34.68 ± 4.16 <sup>a</sup>   | 43.57 ± 8.31 <sup>a</sup>   |

注：相同指标不同小写字母表示两组间差异有显著性( $P < 0.05$ )

90.62%, SOD 活性分别提高 23.30% 和 38.63%, POD 活性分别提高 56.18% 和 79.91%, APX 活性分别提高 61.22% 和 64.13%, GR 活性分别提高 40.50% 和 50.74%。

**2.5 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗内源激素含量的影响** 结果见表 5。添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 可以显著提高低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的 IAA、ZR、GA<sub>3</sub> 和 JA 含量, 降低其 ABA 含量。培养基中添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA, 怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗 IAA 含量分别是对照组的 4.44 倍和 4.21 倍, ZR 含量分别是对照组的 2.27 倍和 2.22 倍, GA<sub>3</sub> 含量分别是对照组

的 1.58 倍和 1.66 倍, JA 含量分别是对照组的 1.46 倍和 1.39 倍, ABA 含量分别是对照组的 68.10% 和 62.74%。

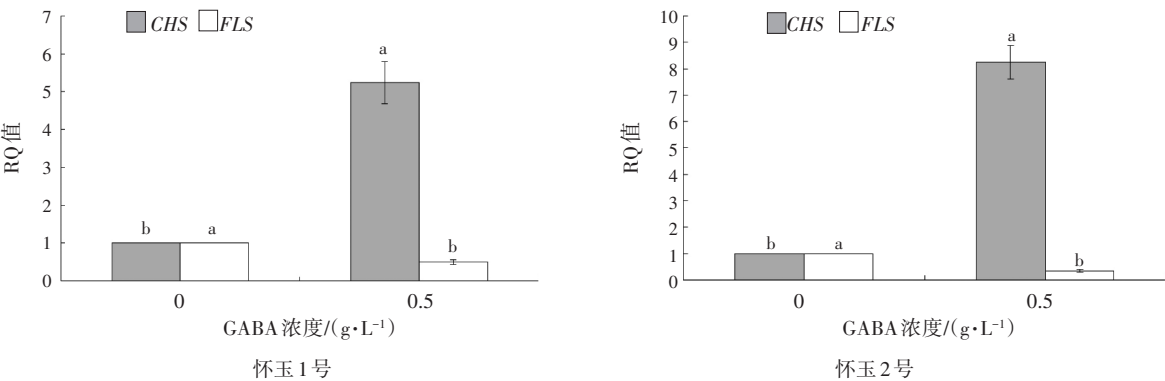
**2.6 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗 *CHS* 和 *FLS* 基因表达的影响** 结果见图 1。与对照组 (0 g·L<sup>-1</sup> GABA) 相比, 经 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 处理后可以显著提高低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的 *CHS* 基因的相对表达量(RQ 值), 降低其 *FLS* 基因的相对表达量。培养基中添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 的怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗 *CHS* 基因的 RQ 值分别是对照组的 5.24 倍和 8.24 倍, *FLS* 基因的 RQ 值分别是对照组的

表 5 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗内源激素含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng·g<sup>-1</sup>)

Table 5 Effects of GABA on the endogenous hormone content of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress ( $\bar{x} \pm s$ , ng·g<sup>-1</sup>)

| GABA 浓度/<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | IAA                       |                           | ZR                        |                           | GA <sub>3</sub>           |                           | ABA                       |                           | JA                        |                           |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                  | 怀玉 1 号                    | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                    | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                    | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                    | 怀玉 2 号                    | 怀玉 1 号                    | 怀玉 2 号                    |
| 0                                | 2.85 ± 1.03 <sup>b</sup>  | 3.86 ± 0.98 <sup>b</sup>  | 6.89 ± 1.45 <sup>b</sup>  | 8.23 ± 1.45 <sup>b</sup>  | 24.68 ± 3.15 <sup>b</sup> | 26.28 ± 3.26 <sup>b</sup> | 35.42 ± 1.27 <sup>b</sup> | 36.45 ± 3.83 <sup>b</sup> | 33.45 ± 2.05 <sup>b</sup> | 38.23 ± 2.27 <sup>b</sup> |
| 0.5                              | 12.66 ± 1.39 <sup>a</sup> | 16.24 ± 1.25 <sup>a</sup> | 15.63 ± 3.76 <sup>a</sup> | 19.26 ± 2.87 <sup>a</sup> | 38.27 ± 2.94 <sup>a</sup> | 43.85 ± 1.28 <sup>a</sup> | 24.12 ± 2.85 <sup>a</sup> | 22.87 ± 2.51 <sup>a</sup> | 48.82 ± 1.19 <sup>a</sup> | 53.28 ± 1.54 <sup>a</sup> |

注：相同指标不同小写字母表示两组间差异有显著性( $P < 0.05$ )



注：相同指标不同小写字母表示两组间差异有显著性( $P < 0.05$ )

图 1 GABA 对低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗 *CHS* 和 *FLS* 基因表达的影响

Figure 1 Effect of GABA on *CHS* and *FLS* gene expression of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain under low temperature stress

50.2% 和 33.4%。

**2.7 低温胁迫下 GABA 处理的怀玉山三叶青试管苗生长与生理指标的相关性分析** 结果见表 6。增殖系数(MC)与株高(PH)、鲜质量(FM)、干质量(DM)、抗坏血酸(AsA)含量、吲哚乙酸(IAA)含量、玉米素核苷(ZR)含量、赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量、茉莉酸(JA)含量均呈非常显著正相关关系( $P<0.01$ )，与可溶性糖(SS)含量、还原型谷胱甘肽(GSH)含量和查尔酮合酶(*CHS*)基因表达均呈显著正相关关系( $P<0.05$ )，但与黄酮醇合酶(*FLS*)基因表达呈非常显著负相关关系( $P<0.01$ )，与超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)产生速率、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量和MDA含量均呈显著负相关关系( $P<0.05$ )。说明低温胁迫下GABA处理的怀玉山三叶青试管苗生长与吲哚乙酸(IAA)含量、玉米素核苷(ZR)含量、赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量、茉莉酸(JA)含量、可溶性糖(SS)含量、抗坏血酸(AsA)含量、还原型谷胱甘肽

(GSH)含量和查尔酮合酶(*CHS*)基因表达的提高正相关。因此，适当浓度的GABA可以调控内源植物激素和渗透调节物质含量、抗氧化物质含量以及次生代谢物关键基因表达，以促进低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长。

3 讨论

三叶青喜凉爽气候，较耐低温，在 20~35 ℃时生长较好，冬春季平均温度低于 5~10 ℃时，三叶青停止生长<sup>[36]</sup>。在江西上饶地区，怀玉山三叶青怀玉 1 号和怀玉 2 号在 4~7 月、9 月下旬~11 月下旬地上部分快速生长，其他季节处于缓慢生长或休眠状态，在 12 月~次年 2 月由于温度低于 5 ℃时，会发生冻害，需要套袋抗冻<sup>[37]</sup>。本试验结果表明，添加不同浓度(0.1~0.7 g·L<sup>-1</sup>)的 GABA 可以显著促进低温胁迫下怀玉山三叶青 2 个栽培种怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗增

表 6 低温胁迫下 GABA 处理的怀玉山三叶青试管苗生长与生理指标的相关性分析  
Table 6 Correlation analysis between growth and physiological indexes of *T. hemsleyanum* Diels et Gilg from Huaiyu Mountain plantlets treated by GABA under low temperature stress

| 相关性                           | MC | PH                   | FM                   | DM                   | TWC                  | SP    | SS                 | Pro                | RC                  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | MDA                   | O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> | GSH                   | AsA                  | SOD                  | POD                  | APX                  | GR                   | IAA                  | ZR                   | GA <sub>3</sub>      | ABA                   | JA                   | CHS                  | FLS                   |
|-------------------------------|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| MC                            | 1  | 0.997 <sup>***</sup> | 0.996 <sup>***</sup> | 0.992 <sup>***</sup> | 0.993 <sup>***</sup> | 0.202 | 0.663 <sup>*</sup> | 0.200              | -0.273              | -0.673 <sup>*</sup>           | -0.666 <sup>*</sup>   | -0.771 <sup>*</sup>          | 0.671 <sup>*</sup>    | 0.923 <sup>***</sup> | 0.274                | 0.211                | 0.272                | 0.103                | 0.999 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | -0.790 <sup>*</sup>   | 0.963 <sup>***</sup> | 0.684 <sup>*</sup>   | -0.999 <sup>***</sup> |
| PH                            |    | 1                    | 0.987 <sup>***</sup> | 0.779 <sup>*</sup>   | 0.998 <sup>***</sup> | 0.229 | 0.673 <sup>*</sup> | 0.234              | -0.180              | -0.669 <sup>*</sup>           | -0.675 <sup>*</sup>   | -0.663 <sup>*</sup>          | 0.678 <sup>*</sup>    | 0.995 <sup>***</sup> | 0.104                | 0.137                | 0.199                | 0.127                | 0.999 <sup>***</sup> | 0.996 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | -0.679 <sup>*</sup>   | 0.998 <sup>***</sup> | 0.995 <sup>***</sup> | -0.998 <sup>***</sup> |
| FM                            |    |                      | 1                    | 0.677 <sup>*</sup>   | 0.998 <sup>***</sup> | 0.133 | 0.675 <sup>*</sup> | 0.240              | -0.282              | -0.668 <sup>*</sup>           | -0.676 <sup>*</sup>   | -0.762 <sup>*</sup>          | 0.779 <sup>*</sup>    | 0.994 <sup>***</sup> | 0.109                | 0.240                | 0.203                | 0.331                | 0.999 <sup>***</sup> | 0.995 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | -0.677 <sup>*</sup>   | 0.998 <sup>***</sup> | 0.996 <sup>***</sup> | -0.997 <sup>***</sup> |
| DM                            |    |                      |                      | 1                    | 0.671 <sup>*</sup>   | 0.143 | 0.231              | 0.227              | -0.241              | -0.662 <sup>*</sup>           | -0.234                | -0.667 <sup>*</sup>          | 0.243                 | 0.995 <sup>***</sup> | 0.109                | 0.154                | 0.112                | 0.148                | 0.685 <sup>*</sup>   | 0.688 <sup>*</sup>   | 0.684 <sup>*</sup>   | -0.995 <sup>***</sup> | 0.789 <sup>*</sup>   | 0.655 <sup>*</sup>   | -0.688 <sup>*</sup>   |
| TWC                           |    |                      |                      |                      | 1                    | 0.247 | 0.686 <sup>*</sup> | 0.265              | -0.107              | -0.678 <sup>*</sup>           | -0.687 <sup>*</sup>   | -0.671 <sup>*</sup>          | 0.689 <sup>*</sup>    | 0.990 <sup>***</sup> | 0.225                | 0.653 <sup>*</sup>   | 0.123                | 0.147                | 0.997 <sup>***</sup> | 0.996 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | -0.667 <sup>*</sup>   | 0.994 <sup>***</sup> | 0.993 <sup>***</sup> | -0.992 <sup>***</sup> |
| SP                            |    |                      |                      |                      |                      | 1     | 0.675 <sup>*</sup> | 0.677 <sup>*</sup> | -0.132              | -0.120                        | -0.673 <sup>*</sup>   | -0.199                       | 0.666 <sup>*</sup>    | 0.192                | 0.998 <sup>***</sup> | 0.898 <sup>***</sup> | 0.994 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | 0.121                | 0.116                | 0.126                | -0.135                | 0.108                | 0.148                | -0.103                |
| SS                            |    |                      |                      |                      |                      |       | 1                  | 0.127              | -0.661 <sup>*</sup> | -0.684 <sup>*</sup>           | -0.987 <sup>***</sup> | -0.674 <sup>*</sup>          | 0.999 <sup>***</sup>  | 0.659 <sup>*</sup>   | 0.663 <sup>*</sup>   | 0.679 <sup>*</sup>   | 0.669 <sup>*</sup>   | 0.681 <sup>*</sup>   | 0.674 <sup>*</sup>   | 0.675 <sup>*</sup>   | 0.678 <sup>*</sup>   | -0.115                | 0.665 <sup>*</sup>   | 0.671 <sup>*</sup>   | -0.658 <sup>*</sup>   |
| Pro                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    | 1                  | -0.132              | -0.158                        | -0.123                | -0.232                       | 0.112                 | 0.288                | 0.688 <sup>*</sup>   | 0.672 <sup>*</sup>   | 0.991 <sup>***</sup> | 0.680 <sup>*</sup>   | 0.127                | 0.224                | 0.235                | -0.107                | 0.106                | 0.159                | -0.296                |
| RC                            |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    | 1                   | 0.657 <sup>*</sup>            | 0.660 <sup>*</sup>    | 0.148                        | -0.659 <sup>*</sup>   | -0.169               | -0.130               | -0.131               | -0.657 <sup>*</sup>  | -0.653 <sup>*</sup>  | -0.187               | -0.199               | -0.198               | 0.100                 | -0.171               | -0.167               | 0.255                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     | 1                             | 0.685 <sup>*</sup>    | 0.999 <sup>***</sup>         | -0.690 <sup>*</sup>   | -0.672 <sup>*</sup>  | -0.101               | -0.126               | -0.117               | -0.134               | -0.676 <sup>*</sup>  | -0.684 <sup>*</sup>  | -0.681 <sup>*</sup>  | 0.138                 | -0.670 <sup>*</sup>  | -0.148               | 0.661 <sup>*</sup>    |
| MDA                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               | 1                     | 0.675 <sup>*</sup>           | -0.995 <sup>***</sup> | -0.661 <sup>*</sup>  | -0.661 <sup>*</sup>  | -0.677 <sup>*</sup>  | -0.666 <sup>*</sup>  | -0.679 <sup>*</sup>  | -0.676 <sup>*</sup>  | -0.177 <sup>*</sup>  | -0.680 <sup>*</sup>  | 0.118                 | -0.667 <sup>*</sup>  | -0.672 <sup>*</sup>  | 0.160 <sup>*</sup>    |
| O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>  |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       | 1                            | -0.681 <sup>*</sup>   | -0.672 <sup>*</sup>  | -0.178               | -0.106               | -0.196               | -0.115               | -0.672 <sup>*</sup>  | -0.682 <sup>*</sup>  | -0.677 <sup>*</sup>  | 0.142                 | -0.667 <sup>*</sup>  | -0.238               | 0.658 <sup>*</sup>    |
| GSH                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              | 1                     | 0.967 <sup>*</sup>   | 0.951 <sup>*</sup>   | 0.970 <sup>*</sup>   | 0.958 <sup>*</sup>   | 0.973 <sup>*</sup>   | 0.980 <sup>*</sup>   | 0.982 <sup>*</sup>   | 0.984 <sup>*</sup>   | -0.927 <sup>*</sup>   | 0.972 <sup>*</sup>   | 0.972 <sup>*</sup>   | -0.965 <sup>*</sup>   |
| AsA                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       | 1                    | 0.163                | 0.102                | 0.262                | 0.294                | 0.998 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | 0.997 <sup>***</sup> | -0.992 <sup>***</sup> | 0.999 <sup>***</sup> | 0.680 <sup>*</sup>   | -0.998 <sup>***</sup> |
| SOD                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      | 1                    | 0.996 <sup>***</sup> | 0.996 <sup>***</sup> | 0.996 <sup>***</sup> | 0.196                | 0.190                | 0.201                | -0.199                | 0.280                | 0.227                | -0.274                |
| POD                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      | 1                    | 0.992 <sup>***</sup> | 0.998 <sup>***</sup> | 0.129                | 0.124                | 0.133                | -0.146                | 0.216                | 0.655 <sup>*</sup>   | -0.212                |
| APX                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      | 1                    | 0.997 <sup>***</sup> | 0.194                | 0.192                | 0.201                | -0.194                | 0.177                | 0.215                | -0.268                |
| GR                            |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      | 1                    | 0.222                | 0.119                | 0.128                | -0.233                | 0.207                | 0.241                | -0.100                |
| IAA                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      | 1                    | 0.999 <sup>***</sup> | 0.976 <sup>*</sup>   | -0.682 <sup>*</sup>   | 0.999 <sup>***</sup> | 0.690 <sup>*</sup>   | -0.998 <sup>***</sup> |
| ZR                            |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      |                      | 1                    | 0.999 <sup>***</sup> | -0.681 <sup>*</sup>   | 0.998 <sup>***</sup> | 0.683 <sup>*</sup>   | -0.995 <sup>***</sup> |
| GA <sub>3</sub>               |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      | 1                    | -0.679 <sup>*</sup>   | 0.998 <sup>***</sup> | 0.688 <sup>*</sup>   | -0.996 <sup>***</sup> |
| ABA                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      | 1                     | -0.188 <sup>*</sup>  | -0.661 <sup>*</sup>  | 0.990 <sup>***</sup>  |
| JA                            |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                       | 1                    | 0.688 <sup>*</sup>   | -0.999 <sup>***</sup> |
| CHS                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                       |                      | 1                    | -0.689 <sup>*</sup>   |
| FLS                           |    |                      |                      |                      |                      |       |                    |                    |                     |                               |                       |                              |                       |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                       |                      |                      | 1                     |

注：\*\*、\*分别表示在 0.01 和 0.05 水平上具有相关性

殖系数、株高、鲜质量及干质量的增加。其中, 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 的促进效应最好。本研究探究的低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗生长的 GABA 最适浓度与白明月等<sup>[22]</sup>在越橘试管苗以及宋春波<sup>[15]</sup>、方筱琴<sup>[16]</sup>和廖界仁<sup>[38]</sup>等在低温胁迫下桃和茶树的研究结果相同, 但与郑友峰<sup>[39]</sup>在低温胁迫下苋菜的研究不同, 究其原因, 可能是因为植物种类存在差异所致。

在低温胁迫下, 植物为了适应寒冷的环境, 其内源激素含量会发生相应的变化, 如低温胁迫后不同温敏性油菜的内源 IAA 和 ABA 含量呈先上升后降低的趋势<sup>[40]</sup>。低温处理下, 肉饼类兜兰内源 IAA 含量显著提高, 而杏黄兜兰 IAA 含量则显著降低, 黄花系肉饼兜兰、红花系肉饼兜兰和杏黄兜兰 GA<sub>3</sub> 和 ZR 含量先增后减, ABA 含量在初期均突增<sup>[41]</sup>。GABA 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸, 可作为信号分子调节植物抵抗逆境胁迫<sup>[42]</sup>。本试验结果表明, 与对照组 (0 g·L<sup>-1</sup> GABA) 相比, 添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 可以显著提高低温胁迫下怀玉山三叶青 2 个栽培种怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗的 IAA、ZR、GA<sub>3</sub> 和 JA 含量, 降低其 ABA 含量。低温胁迫下 GABA 处理引起怀玉山三叶青试管苗生长与生理指标的相关性分析也表明, 低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长与 IAA、ZR、GA<sub>3</sub>、JA 含量均呈非常显著正相关关系。但白明月等<sup>[22]</sup>发现, 添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 可显著提高越橘试管苗 IAA 和异戊烯基腺嘌呤 (iPA) 含量, 降低 ABA、GA<sub>3</sub> 及茉莉酸甲酯 (JA-me) 含量。究其原因, 可能是 GABA 处理越橘试管苗不是在低温胁迫条件下。

植物的抗寒性与抗氧化系统密切相关。在遭受低温胁迫时, 植株体内会产生大量 ROS, 从而引起膜脂过氧化程度增加, 造成膜系统损伤, 导致植物生理生化代谢紊乱, 并严重抑制植物生长发育<sup>[43]</sup>, 抗坏血酸—谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环是植物体内清除 ROS 的重要途径, 其中 AsA 和 GSH 是 AsA-GSH 循环中重要的抗氧化物质, 既可直接还原 ROS, 又可以作为酶底物清除 ROS<sup>[44]</sup>。同时植物还会以产生抗氧化酶等方式来清除体内产生的活性氧物质和自由基离子, 从而抵御低温产生的伤害<sup>[45]</sup>。本试验结果表明, 与对照组 (0 g·L<sup>-1</sup> GABA) 相比, 添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 可以显著提高低温胁迫下怀玉山三叶青怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗的 GSH、AsA 含量及 SOD、POD、APX、GR 活性。相关性分析也表明, 低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长与 AsA、GSH 的含量呈显著正相关关系。本试验结果与白明月等<sup>[22]</sup>的越橘试管苗试验的

结果一致。

植物会产生一系列生理生态变化响应低温胁迫。研究表明逆境胁迫引起的 ROS [主要包括超氧阴离子 (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由基 (·OH) 和单线态氧 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 等] 大量积累将引起氧化胁迫<sup>[46]</sup>。这种氧化胁迫会导致植物细胞核酸功能发生改变, 基因发生突变, 蛋白质结构改变, 酶活性降低, 最终影响植物的正常生长发育<sup>[47]</sup>。细胞膜在植物抗逆性方面起着重要作用, 膜系统的稳定性与植物的抗逆性密切相关。在低温胁迫下, 细胞内活性氧代谢的平衡被破坏, 产生过多的 ROS, 引发或加剧膜脂质过氧化作用, 造成细胞膜系统的损害。因此, 清除 ROS 是细胞膜保持良好稳定性的关键<sup>[48]</sup>。本试验结果表明, 与对照组 (0 g·L<sup>-1</sup> GABA) 相比, 添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 可以显著降低低温胁迫下怀玉山三叶青怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗的相对电导率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量、MDA 含量和 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 产生速率。相关性分析也表明, 低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长与 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 产生速率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量均呈显著负相关关系。本试验结果与白明月等<sup>[22]</sup>越橘试管苗试验的结果一致。

在低温胁迫下, 植物的自身会产生对逆境的适应性反应, 植物体内的渗透调节物质大量积累, 使植物具有渗透调节的能力<sup>[49]</sup>。低温胁迫时, 细胞内溶质主动积累, 细胞渗透势下降, 这是渗透调节的关键, 参与渗透调节的物质种类有很多, 其中可溶性糖、可溶性蛋白质、游离脯氨酸等含量会发生变化, 保持植物细胞原生质与环境的渗透平衡以适应逆境<sup>[50]</sup>。植物在低温逆境条件下, 通常以提高自身体内的可溶性糖含量来抵抗寒冷; 同时低温胁迫还可引起植物体内可溶性蛋白质含量递增, 并生成新的蛋白质, 对植物的抗寒起到重要的调节作用; 低温胁迫容易造成植物体内的游离脯氨酸含量发生较大变化, 植物对低温胁迫的抗性强弱主要体现在游离脯氨酸积累的差异上<sup>[51]</sup>。本试验结果表明, 与对照组 (0 g·L<sup>-1</sup> GABA) 相比, 添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 可以显著促进低温胁迫下怀玉山三叶青怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量的增加。相关性分析也表明, 低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长与 SS 含量呈显著正相关关系。本试验结果和贾琰等<sup>[20]</sup>越橘试管苗试验的结果一致, 但与白明月等<sup>[22]</sup>越橘试管苗试验的结果不完全一致, 与 0 g·L<sup>-1</sup> GABA 相比, 培养基中添加 0.5 g·L<sup>-1</sup> GABA 后, 越橘试管苗中可溶性蛋白含量无显著变化, 但可溶性糖和脯氨



酸含量非常显著增加。

在环境胁迫条件下,通过增加植物体内黄酮化合物来防御环境胁迫,黄酮作为植物综合防御体系的一部分,具有一定的清除氧自由基的能力<sup>[52]</sup>。CHS 是植物黄酮类化合物生物合成的关键限速酶,环境胁迫可诱导黄酮生物合成的关键酶 CHS 的活性和含量上升<sup>[53]</sup>。类黄酮是植物次级代谢中很大的一个家族,其中黄酮醇是无色的次级代谢产物,FLS 是类黄酮代谢中一个重要的节点酶<sup>[54]</sup>。黄酮醇在植物体内有着重要的生物学功能,不仅可调控植物花色形成、保护植物抵御紫外损伤,还可作为信号分子响应营养胁迫、调控植物生长激素运输等作用<sup>[55]</sup>。本试验结果表明,与对照组( $0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  GABA)相比,添加  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  GABA 可以显著提高低温胁迫下怀玉山三叶青怀玉 1 号和怀玉 2 号试管苗的 CHS 基因的相对表达量,促进黄酮生物合成,降低其 FLS 基因的相对表达量,减少黄酮醇生物合成。相关性分析也表明,低温胁迫下怀玉山三叶青试管苗的生长与查尔酮合酶(CHS)基因表达均呈显著正相关关系,但与黄酮醇合酶(FLS)基因表达呈非常显著负相关关系。

## 参考文献:

- [1] 刘守赞,蒋玲苔,张韵,等.蓝、紫单色光处理对三叶青生理及总黄酮含量时空变化的影响[J].中国生态农业学报,2023,31(6):885-894.
- [2] 王铁峰,苏洁,王伟东,等.三叶青调节Th17/Treg平衡抗类风湿性关节炎的作用及机制研究[J].中国临床药理学与治疗学,2023,28(2):138-146.
- [3] 孙永,李红艳,刘小如,等.动态超高压微射流技术在三叶青叶黄酮的提取中的应用[J].食品工业科技,2013,34(2):273-276.
- [4] SUN Y, HUI Q, CHEN R, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by the phenolics of *Tetragium hemsleyanum* leaves and their antitumor effects in H22 tumor-bearing mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 349-364.
- [5] SUN Y, QIN Y, LI H, et al. Rapid characterization of chemical constituents in Radix Tetragium, a functional herbal mixture, before and after metabolism and their antioxidant / antiproliferative activities[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 300-318.
- [6] SUN Y, RONG T, CHEN F, et al. The phytochemical composition, metabolites, bioavailability and *in vivo*, antioxidant activity of *Tetragium hemsleyanum* leaves in rats[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 179-193.
- [7] SUN Y, TAO R, CHEN F, et al. The phenolic profiles of radix *Tetragium hemsleyanum* after solid phase extraction (SPE) and their antitumor effects and antioxidant activities in H22 tumor-bearing mice[J]. Food & Function, 2017, 8: 4014-4027.
- [8] 倪小兵,夏凌云,牛玉明,等.三叶青提取物对口腔鳞状细胞癌生物学行为的体外研究[J].临床口腔医学杂志,2020,36(7):395-398.
- [9] 夏瑾华,李丹丹,李然,等.怀玉山三叶青烟草病毒增殖蛋白 2A-like 基因克隆及其功能分析[J].江苏农业科学,2023,51(2):36-43.
- [10] 李晋明,叶颖俊,沈静琳,等.上饶市中药材资源及规范化种植浅析[J].实用中西医结合临床,2021,21(3):156-159.
- [11] 洪彩艳,周娟,蔡洪.怀玉山三叶青仿野生栽培技术[J].江西农业,2015,8(11):62.
- [12] GILLIHAM M, TYERMAN S D. Linking metabolism to membrane signaling: The GABA-malate connection[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(4): 295-301.
- [13] RAMESH S A, TYERMAN S D, GILLIHAM M, et al.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(9): 1577-1603.
- [14] UZMA J S, KHAN M I R, ANSARI M I. Role of GABA transaminase in the regulation of development and senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. Current Plant Biology, 2019, 2019(19): 100119.
- [15] 宋春波,方怡楠,吴哲铭,等. $\gamma$ -氨基丁酸对低温胁迫下桃果实多胺代谢的影响[J].果树学报,2016,33(5):552-562.
- [16] 方筱琴,徐利伟,朱婷婷,等. $\gamma$ -氨基丁酸对低温胁迫下桃果实蔗糖代谢的影响[J].核农学报,2020,34(7):1470-1479.
- [17] WANG Y S, LUO Z S, HUANG X D, et al. Effect of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 168: 132-137.
- [18] HAN S, NAN Y, QU W, et al. Exogenous  $\gamma$ -Aminobutyric acid treatment that contributes to regulation of malate metabolism and ethylene synthesis in applefruit during storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(51): 13473-13482.
- [19] 龚动庭.硅与 $\gamma$ -氨基丁酸引发对低温胁迫下油菜种子萌发与幼苗生长的影响[D].杭州:浙江大学,2019.
- [20] 贾琰,任鹏飞,赵宏伟,等.孕穗期冷水胁迫下施用 $\gamma$ -氨基丁酸对寒地水稻氮光合效率的调控效应[J].东北农业大学学报,2020,51(1):1-12.
- [21] 黄娟.外源GABA对温度胁迫下黄瓜生长的影响[D].重庆:西南大学,2015.
- [22] 白明月,吕爽爽,夏秀英. $\gamma$ -氨基丁酸对越橘试管苗生长及相关生理代谢的影响[J].植物生理学报,2022,58(3):577-586.
- [23] 杨英楠,徐婷婷,马杰,等.以相对电导率研究菊花舌状花抗寒性遗传变异及其分子标记[J].植物生理学报,2020,56(2):275-284.
- [24] YAN J W, LI J, ZHANG H P, et al. *ZmWRKY104* positively regulates salt tolerance by modulating *ZmSOD4* expression in maize[J]. The Crop Journal, 2022, 10(2): 555-564.
- [25] 蒋艺,邱正坤,颜爽爽,等.不同逆境胁迫处理对茄子品质指标的影响[J].北方园艺,2023,(11):15-21.
- [26] 谢永凯,宋晋瑶,刘敏,等.水分胁迫下冬小麦脯氨酸含量高光谱监测[J].应用生态学报,2023,34(2):463-470.
- [27] 毛婷婷,褚梦颖,张辉红,等.黄连原小檗碱类生物碱快速制备及清除超氧阴离子活性研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学



- 版), 2021, 42(2): 86-92.
- [28] 刘畅, 应译娴, 邱岳, 等. HPLC法测定四种食用坚果种子中还原型谷胱甘肽(GSH)和蛋白巯基(P-SH)含量[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 1-5, 10.
- [29] KAMPFENKEL K, MONTAGU V M, INZÉ D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 225(1): 165-167.
- [30] 王继庆, 任毅, 时晓磊, 等. 小麦籽粒超氧化物歧化酶(SOD)活性全基因组关联分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(11): 2249-2260.
- [31] 王丽丽, 战帅帅, 谢磊, 等. 新疆小麦籽粒过氧化物酶(POD)活性检测及其基因等位变异检测[J]. 新疆农业科学, 2020, 57(10): 1765-1774.
- [32] 黄真池, 廖春晓, 赖少娟, 等. 尾叶桉不同类型愈伤组织APX类基因转录水平及酶活性的差异[J]. 东北林业大学学报, 2021, 49(6): 11-15.
- [33] 李慧, 阚家亮, 王影, 等. 豆梨中谷胱甘肽还原酶基因的分离、表达特点及酶活性分析[J]. 果树学报, 2019, 36(1): 11-20.
- [34] 林国卫, 武思梦, 张悦, 等. 三叶青两个受体蛋白基因的克隆及功能分析[J]. 山东农业科学, 2023, 55(6): 7-14.
- [35] 洪森荣, 黄丹丹, 黄诗慧, 等. 怀玉山三叶青2个栽培种块根的转录组分析[J]. 福建农业学报, 2021, 36(1): 24-35.
- [36] 范适, 胡春梅, 李有清, 等. 三叶青的研究进展[J]. 湖南生态科学学报, 2018, 5(2): 46-51.
- [37] 孙健, 沈晓霞, 陈加红, 等. 药用植物三叶青种质多样性与栽培管理的研究进展[J]. 科技通报, 2018, 34(1): 13-17.
- [38] 廖界仁. 外源性 $\gamma$ -氨基丁酸提高茶树抗寒性机理的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [39] 郑友峰.  $\gamma$ -氨基丁酸对低温胁迫下苋菜生长及光合特性的影响[D]. 福建农林大学, 2022.
- [40] 马学才, 方彦, 刘丽君, 等. 低温胁迫下不同温敏性油菜保护酶活性及内源激素变化[J]. 甘肃农业大学学报, 2021, 56(3): 86-94.
- [41] 周锦业, 崔学强, 李秀玲, 等. 低温胁迫过程中兜兰内源激素的动态变化[J]. 北方园艺, 2020, (21): 50-55.
- [42] AGHDAM M S, NADERI R, SARCHESHMEH M A A, et al. Amelioration of postharvest chilling injury in anthurium cut flowers by  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)treatments[J]. Postharvest Biology & Technology, 2015, 110: 70-76.
- [43] 庄得凤, 王成, 包金花, 等. 低温胁迫下单瓣黄刺玫抗氧化酶活性及相关基因表达[J]. 东北林业大学学报, 2023, 51(4): 89-92, 107.
- [44] 李进, 雷斌, 翟梦华, 等. 棉花幼苗AsA-GSH循环对低温胁迫的响应机制研究[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 221-228.
- [45] 赵悦, 赵艳艳, 黄霞, 等. 夜间低温胁迫对番茄抗氧化酶活性的影响[J]. 青海大学学报, 2021, 39(3): 34-40.
- [46] 柯媛媛, 陈翔, 倪芊芊, 等. 低温逆境胁迫下小麦ROS代谢及调控机制研究进展[J]. 大麦与谷类科学, 2021, 38(1): 1-6, 21.
- [47] 张腾国, 胡馨丹, 李萍, 等. 盐及低温胁迫对油菜ROS和抗氧化酶活性的影响[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2019, 55(4): 497-505.
- [48] 杨宁, 丁芳霞, 李宜坤, 等. 低温胁迫对高山离子芥试管苗膜脂过氧化及AsA-GSH循环系统的影响[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2014, 50(5): 79-84, 105.
- [49] 李莹, 杨超群, 高梓峰, 等. 低温胁迫下4份烟草品种苗期叶绿素及渗透调节物质含量的变化[J]. 延边大学农学学报, 2021, 43(2): 44-52.
- [50] 邹凯茜, 商桑, 田丽波, 等. 低温胁迫对嫁接苦瓜幼苗渗透调节物质的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(8): 1533-1539.
- [51] 张富玮, 张东亚, 李建贵. 低温胁迫对蓝靛果忍冬渗透调节物质的影响[J]. 经济林研究, 2017, 35(2): 127-131.
- [52] 祖艳群, 梅馨月, 闵强, 等. 砷胁迫对三七皂苷和黄酮含量、关键酶活性的影响及其蛋白质组分析[J]. 应用生态学报, 2016, 27(12): 4013-4021.
- [53] 潘德灼, 林伟彬, 谭芳林, 等. 红树植物秋茄查尔酮合酶基因克隆及其在盐胁迫下的表达分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, 46(2): 180-186.
- [54] 李海鸿, 刘雅莉, 刘红利, 等. 葡萄风信子黄酮醇合酶基因克隆和表达分析[J]. 西北林学院学报, 2019, 34(2): 116-121.
- [55] 邹庆军, 汪涛, 郭巧生, 等. 杭菊黄酮醇合酶基因的原核表达与重组蛋白体外活性研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3471-3476.

(编辑: 梁进权)