低温对茶树花粉管抑制作用与 NO 关系的研究

王伟东[1]，蒋　芯[1]，杜昱林[1]，王玉花[1,2,*]，黎星辉[1,2,*]

（[1]南京农业大学茶叶科学研究所，南京 210095；[2]江苏省茶学博士后科研工作站，江苏苏州 215128）

摘　要：以无性系茶树品种‘龙井 43’花粉为材料，研究了低温对茶树花粉萌发和花粉管伸长的影响及其与一氧化氮（NO）的关系。结果显示低温显著抑制了茶树花粉萌发和花粉管伸长，且表现出明显的时间依赖性；外源 NO 供体硝普钠（SNP）产生类似的抑制效应，并表现出明显的浓度依赖性，其抑制效应被 NO 清除剂（cPTIO）和一氧化氮合酶（NOS）抑制剂（L-NNA）所缓解。此外，低温处理促进茶树花粉管 NO 释放并伴随着 NOS 活性的提高。上述研究结果表明，低温抑制茶树花粉萌发和花粉管伸长与其诱导 NO 释放有关，且低温诱导的 NO 释放部分依赖于 NOS 催化产生。

关键词：茶树；低温；花粉萌发；花粉管伸长；一氧化氮

中图分类号：S 571.1　　　　**文献标志码**：A　　　　**文章编号**：0513-353X（2013）08-1535-06

A Study on the Involvement of Nitric Oxide in Inhibiting Pollen Tube Growth of Tea Plant（*Camellia sinensis*）Under Low-temperature

WANG Wei-dong[1]，JIANG Xin[1]，DU Yu-lin[1]，WANG Yu-hua[1,2,*]，and LI Xing-hui[1,2,*]

（[1]*Tea Research Institute*，*Nanjing Agricultural University*，*Nanjing* 210095，*China*；[2]*The Post-Doctoral Research Station for Tea Science of Jiangsu Province*，*Suzhou*，*Jiangsu* 215128，*China*）

Abstract：The pollen germination and pollen tube growth of tea plant，as well as their relationship with nitric oxide（NO）under low-temperature were studied using pollen of culivar‘Longjing 43’. The results showed that low-temperature significantly inhibited the tea pollen germination and pollen tube growth in a time-dependent manner. Similar inhibitory effects in a dose-dependent manner were observed with exogenous NO donor（Sodium Nitroprusside，SNP）. Both NO scavenger（cPTIO）and nitric oxide synthase（NOS）inhibitor（L-NNA）partially alleviated this inhibitory effect. Furthermore，the NO releasing along with the NOS activity were promoted in tea pollen tubes under low-temperature. The results indicated that the inhibitory effects of low-temperature treatment on tea pollen germination and pollen tube growth are related to NO generating from NOS activity.

Key words：tea plant；low-temperature；pollen germination；pollen tube growth；nitric oxide

目前茶树[*Camellia sinensis*（L.）O. Kuntze]育种的主要方法仍然是有性杂交（董丽娟，2001）。由于茶树盛花期一般处于 10 月中下旬至 11 月中旬，期间经常会遭遇寒冷天气危害，致使花粉活力

收稿日期：2013－03－28；**修回日期**：2013－05－17

基金项目：国家自然科学基金项目（31000315，30972403，30800884）；现代农业产业技术体系建设专项资金项目（CARS-23）；江苏省企业博士后集聚计划项目（2010）；中国博士后基金项目（20100481158）；林木遗传与生物技术省部共建重点实验室（南京林业大学）开放课题（FGB200904）；教育部博士点新教师基金项目（20090097120049）；江苏省科技支撑计划资金项目（BE2011319，BE2012440，BE2012441）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：wangyuhua@njau.edu.cn；lxh@njau.edu.cn）

降低。花期低温在果树上研究较为广泛：低温导致桃树花粉萌发率低，花粉管生长缓慢（李晓林，2005；王华东和唐红，2009）；低温能明显降低李树花粉的萌发率，尤其会减慢花粉萌发和花粉管伸长（张义 等，2003）。然而，关于茶树花期低温的影响及其机制研究尚少。

NO 作为重要的信号分子，在植物对生物和非生物胁迫反应、细胞程序性死亡（PCD）、呼吸作用、光形态建成、果实成熟、叶片伸展、气孔关闭、衰老、种子萌发、开花调控、根发育和激素反应等过程中起着重要的调节作用（Gould et al.，2003；Wendehenne et al.，2004；Delledonne，2005；Lamotte et al.，2005； Wilson et al.，2007；张少颖 等，2007；Besson-Bard et al.，2008）。相关研究表明 NO 参与调控花粉管极性生长：Prado 等（2004）对百合花粉的研究结果表明，NO 可以调节百合花粉管生长方向，并且这种方向调控可以被 NO 清除剂 2 –（4 – 羧基苯）– 4,4,5,5 – 四甲基咪唑 – 1 – 氧 – 3 – 氧化物（cPTIO）消除；He 等（2007）运用 NO 释放剂和清除剂对不同剂量 UV-B 照射的泡桐花粉研究表明，NO 介导了 UV-B 对花粉萌发和花粉管伸长的抑制作用；通过应用显微注射、非损伤微测、免疫荧光标记等技术，Wang 等（2009）发现，NO 释放剂促进白皮松花粉萌发和花粉管伸长，并且具有浓度效应，而抑制剂则抑制白皮松花粉萌发和花粉管生长，同时使花粉管顶端膨大，丧失极性。

本试验中在人工气候箱中模拟花期低温环境，并施加外源 NO 供体、NO 清除剂和一氧化氮合酶（NOS）抑制剂，以探讨低温对茶树花粉萌发和花粉管伸长的影响以及与 NO 的关系，旨在为低温条件下保持茶树花粉活力提供科学依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

茶树供试材料为栽植于南京市中山陵茶园的 5 年生‘龙井 43’品种。于 2012 年 10 月至 11 月上旬茶树盛花期期间，下午 16—17 时采摘处于蕾白期（花蕾膨大欲展开，色白）的花蕾，置于硅胶干燥器内干燥 15 h 左右，用毛笔将花粉轻轻刷下至硫酸纸上，收集备用（陈暄 等，2010）。

1.2 花粉培养及萌发率、花粉管长度检测

称取 0.05 g 新收集的茶树花粉，用毛笔轻轻抖入 20 mL 花粉培养液中，分别置于常温（25 ℃）和低温（4 ℃）人工气候箱中避光悬浮培养 1、2 和 3 h，检测萌发率和花粉管长度。常温（25 ℃）条件下，以含不同浓度 SNP（0、50、100、200 和 1 000 μmol · L^{-1}）的花粉培养液作为对照组，终浓度为 200 μmol · L^{-1} 的 NO 清除剂（cPTIO）和 300 μmol · L^{-1} 的 NOS 抑制剂 N^{ω} – 硝基 – L – 精氨酸（L-NNA）分别与上述不同浓度的 SNP 共培养茶树花粉 2 h。均设 3 次重复。花粉培养液的配制参照陈暄等（2010）所述。

吸取适量培养后的花粉悬浮液于普通光学显微镜（JNOEC XS-212-103，10 × 10 倍）下进行观察，以花粉管的长度达到花粉粒直径的 1/2 以上视为花粉萌发（Vaknin & Eisikowitch，2000；向旭 等，2000），每片观察 6 个视野。花粉萌发率（%）= 萌发花粉粒数/观察花粉总粒数 × 100。

随机选取 200 个萌发的花粉，在 4 倍物镜或 10 倍物镜下用测微尺测量花粉管的长度，根据校正尺的校正换算成花粉管的实际长度（10 × 4 倍镜下，测微尺一小格换算成实际长度为 25 μm；10 × 10 倍镜下，测微尺一小格换算成实际长度为 9.8 μm）。

1.3 NO 释放量检测

分别在含 cPTIO（200 μmol · L^{-1}）、L-NNA（300 μmol · L^{-1}）、SNP（200 μmol · L^{-1}）和对照组花

粉培养液中轻轻抖入 0.02 g 新收集的茶树花粉，分别置于常温（25 ℃）和低温（4 ℃）人工气候箱中避光悬浮培养 2 h。设 3 次重复。

NO 释放量的检测参照 Murphy 和 Noack（1994）、Clarke 等（2008）和 Hu 等（2005）所述方法并作适当改进：过滤收集培养后的茶树花粉，用花粉培养液以 0.02 g · mL^{-1} 浓度重新悬浮，加入 100 U 的 CAT 和 100 U 的 SOD 以除去 ROS 的干扰；5 min 后加入氧合血红素（HbO_2）至终浓度为 10 μmol · L^{-1}，暗培养 5 min，4 ℃、10 000 g 离心 30 s，收集上清液于分光光度计上检测 401 nm 和 421 nm 处吸光值。将所得数据代入公式 $C_{NO} = (A_{401} - A_{421}) / \varepsilon b$。$\varepsilon = 77\ L \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$，$b = 1\ cm$。

HbO_2 贮存液的制备参照 Clarke 等（2008）所述方法：将 25 mg 血红素溶于 1 mL 磷酸缓冲液（pH 7.2），加入 4 mg $Na_2S_2O_4$ 至溶液变为紫红色，于空气中氧化至溶液变为亮浅红色。溶液通过 1 cm × 20 cm，填料柱为 SephdexG-25 的层析柱脱盐，用磷酸缓冲液（pH 7.2）洗脱，流速约为 1 mL · min^{-1}，HbO_2 大约 10 min 时流出，收集后置于冰上避光保存。

1.4　花粉管中 NOS 活性测定

依次称取 0.05 g 新收集的茶树花粉，轻轻抖入含 L-NNA（300 μmol · L^{-1}）和对照组花粉培养液中，分别置于常温（25 ℃）和低温（4 ℃）人工气候箱中避光悬浮培养 2 h。试验设 3 次重复。

酶粗提物的获得参照 Corpas 等（2004）所述方法并作适当改进：将培养后的茶树花粉过滤收集于研钵中，于液氮下匀浆并迅速加入 1 mL 提取液[50 mmol · L^{-1} Hepes（pH 7.2），5% 蔗糖，1 mmol · L^{-1} EDTA，1 mmol · L^{-1} 胃酶抑素，1 mmol · L^{-1} 亮抑酶肽，10 mmol · L^{-1} 还原型谷胱甘肽，1 mmol · L^{-1} PMSF 和 1 mmol · L^{-1} DTT]混匀，4 ℃、10 000 g 离心 20 min，收集上清液，冰上保存。

NOS 活性的测定参照 Murphy 和 Noack（1994）、Hevel 和 Marletta（1994）所述方法并作适当改进：取 1 mL 上述上清液，加入 HbO_2 至终浓度为 10 μmol · L^{-1}，分别测定 0、5 和 10 min 时的 401 和 421 nm 处吸光值。将所得数据代入 1.3 中的公式。

采用考马斯亮蓝（G-250）法（Bradford，1976）测定蛋白质浓度。

1.5　数据统计分析

使用 Excel 2010 和 SPSS 19 软件对数据进行整理和统计学分析，用 Duncan’s 新复极差法进行多重比较。

2　结果与分析

2.1　低温对茶树花粉萌发和花粉管伸长的影响

由表 1 可知，茶树花粉经过低温处理 1 ~ 3 h，花粉萌发率分别比常温处理下低 75.21%、59.68%和 36.95%，花粉管长度分别比常温处理下短 277.27、688.50 和 720.00 μm，表明低温对茶树花粉萌发和花粉管伸长均具显著的抑制效应，并表现出明显的时间依赖性。

表 1　低温对茶树花粉萌发和花粉管伸长的影响

Table 1　Effects of low temperature on tea pollen germination and pollen tube growth

温度/℃ Temperature	时间/h Time	萌发率/% Pollen germination	花粉管长度/μm Pollen tube length
4	1	10.51 ± 0.63 e	55.65 ± 1.68 f
	2	30.73 ± 3.22 d	186.85 ± 2.35 e
	3	55.87 ± 0.98 c	533.33 ± 10.32 c
25	1	85.72 ± 2.36 b	332.92 ± 7.36 d
	2	90.41 ± 0.84 ab	875.35 ± 12.21 b
	3	92.82 ± 0.79 a	1253.33 ± 19.29 a

注：不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上显著性差异，下同。

Note：Different letters are significantly different at $P < 0.05$. The same below.

2.2　NO 对茶树花粉萌发和花粉管伸长的影响

SNP 作为常用的 NO 供体经常被用于研究

NO 在植物体中的生理效应（Neill et al.，2002；Murgia et al.，2004）。表 2 显示，不同浓度的 SNP 处理均抑制了茶树花粉的萌发和花粉管的伸长，且表现出明显的浓度依赖性，以 1 000 μmol · L^{-1} 抑制效应最大。NO 清除剂 cPTIO 和 NOS 抑制剂 L-NNA 缓解了 SNP 对茶树花粉萌发率和花粉管伸长的抑制效应，且 200 μmol · L^{-1} 的 cPTIO 对 SNP 抑制的缓解效用高于 300 μmol · L^{-1} L-NNA 的缓解效用。

表 2 不同浓度 SNP 对茶树花粉萌发和花粉管生长的影响

Table 2 Effects of different concentration of SNP on tea pollen germination and pollen tube growth

处理/(μmol · L^{-1}) Treatment			萌发率/%	花粉管长度/μm
SNP	cPTIO	L-NNA	Pollen germination	Pollen tube length
0	200	0	91.41 ± 0.92 a	1 172.28 ± 32.01 a
0	0	300	91.54 ± 1.68 a	1 164.15 ± 26.43 ab
0	0	0	88.87 ± 2.45 ab	1 161.25 ± 36.61 ab
50	200	0	90.94 ± 1.53 a	1 160.50 ± 29.58 ab
50	0	300	88.71 ± 3.70 ab	1 156.50 ± 20.79 ab
50	0	0	83.80 ± 5.57 bc	1 068.00 ± 25.82 cd
100	200	0	89.37 ± 2.46 ab	1 122.00 ± 32.65 ab
100	0	300	87.20 ± 5.23 ab	1 100.50 ± 24.64 abc
100	0	0	80.64 ± 9.08 cd	1 035.50 ± 29.35 d
200	200	0	87.26 ± 4.45 ab	1 067.00 ± 30.37 bc
200	0	300	83.06 ± 3.87 bc	1 058.25 ± 27.57 bc
200	0	0	74.19 ± 3.14 e	1 010.75 ± 32.20 d
1000	200	0	77.07 ± 8.22 de	1 020.25 ± 26.49 d
1000	0	300	72.96 ± 5.84 e	1 008.25 ± 24.14 d
1000	0	0	61.31 ± 7.77 f	866.75 ± 29.48 e

2.3 低温下茶树花粉管 NO 释放速率的变化

如图 1 所示，低温处理下茶树花粉管 NO 释放速率明显高于常温处理。与对照组相比，无论是低温处理还是常温处理，添加 NO 清除剂 cPTIO 或 NOS 抑制剂 L-NNA 均使茶树花粉管 NO 释放速率显著下降，而添加 NO 释放剂 SNP 导致茶树花粉管 NO 释放速率显著上升。分析表明，低温和外源 NO 释放剂 SNP 均可促进茶树花粉管 NO 的释放，而 cPTIO 和 L-NNA 从一定程度上抑制了 NO 的释放。

2.4 低温下茶树花粉管中 NOS 活性的变化

如图 2 所示，经低温培养 2 h 后，茶树花粉中的一氧化氮合酶（NOS）活性从 1.88 增长到 3.50 nmol · min^{-1} · mg^{-1}。常温处理下，添加 300 μmol · L^{-1} 的 L-NNA，茶树花粉管中 NOS 活性降低到 1.73 nmol · min^{-1} · mg^{-1}；低温处理下，添加 300 μmol · L^{-1} L-NNA，茶树花粉管中 NOS 活性降低到 2.82 nmol · min^{-1} · mg^{-1}。表明低温使茶树花粉管中 NOS 活性升高，L-NNA 抑制了茶树花粉管中 NOS 的活性。

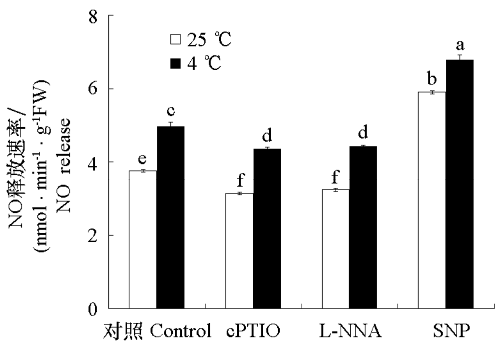

图 1 低温对茶树花粉管 NO 释放速率的影响

Fig. 1 Effect of low-temperature on NO release of tea pollen tubes

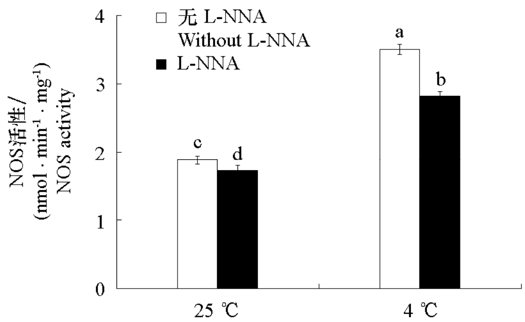

图 2 低温和 L-NNA 对茶树花粉管中 NOS 活性的影响

Fig.2 Effect of low-temperature and L-NNA on NOS activity in tea pollen tubes

3 讨论

植物花期遭遇早春寒和晚霜等低温天气，致使坐果率低下，减产严重等一系列的问题，其实质是由于低温降低了花粉在柱头上的萌发率以及花粉管生长速度（王白坡 等，1989；李晓林，2005）。

本试验研究结果表明，低温能够明显抑制茶树花粉的萌发和花粉管伸长，与王华东和唐红（2009）、李晓林（2005）及张义等（2003）研究低温抑制花粉萌发和花粉管生长结论一致。

有报道指出，NO 可以调节花粉管生长方向并且可以作为花粉管主轴延长生长的负反馈调节因子，即适量的外源 NO 释放剂 SNAP 可以降低花粉管的生长速率（Prado et al.，2004）。本试验结果显示，施加外源 NO 释放剂 SNP 可以降低花粉的萌发率并延缓花粉管的伸长，NO 清除剂 cPTIO 和 NOS 抑制剂 L-NNA 在一定程度上缓解了 SNP 的抑制效应，表明 NO 至少在花粉管生长过程中是一个生长负调节子，这与 He 等（2007）研究外源 NO 对泡桐花粉的萌发和花粉管伸长具有抑制作用的结果一致。

在植物体中，NO 的功能具有二元性：低浓度的 NO 对植物体具有一定的保护作用，而高浓度 NO 则会严重伤害植物组织和细胞（肖强和郑海雷，2004）。大量的研究表明，植物在受到生物或非生物胁迫时，均伴随着 NO 的产生和 NOS 活性的增加：超声波诱导紫杉细胞积累 H_2O_2 和启动程序性死亡，此过程能被 SNP 加强，而被 cPTIO 和 L-NNA 部分阻断（Wang et al.，2006）；细菌、真菌或病毒与植物互作过程中，有一个 NO 爆发性的产生过程，并伴随着 NOS 活性的增加（李翠 等，2009）。本试验结果显示，低温处理下，茶树花粉管 NO 释放量显著增加，而 cPTIO 和 L-NNA 均可以降低茶树花粉管 NO 的释放，这与低温导致拟南芥叶片中 NO 含量上升的结论（Zhao et al.，2009）一致。同时，低温处理使茶树花粉管中 NOS 活性显著增强，而被抑制剂 L-NNA 所缓解，这与低温胁迫下高山离子芥悬浮细胞中 NOS 活性增强的结论（Liu et al.，2010）一致。由此表明，低温诱导茶树花粉管释放 NO 可能部分来源于 NOS 催化产生。

综上所述，低温显著抑制了茶树花粉的萌发和花粉管伸长；NO 参与了低温抑制茶树花粉萌发和花粉管伸长的生理过程，且低温处理下茶树花粉管中 NO 含量的升高部分依赖于 NOS 活性的增加。

References

Besson-Bard A，Pugin A，Wendehenne D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. Annual Review of Plant Biology，59：21–39.

Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem，72：248–254.

Chen Xuan，Peng Ying，Hao Shan，Wang Yu-hua，Fang Wan-ping，Zhang Cai-li，Li Xing-hui. 2010. The study on pollen germination *in vitro* of tea plant（*Camellia sinensis*）. Jiangsu Agricultural Sciences，(6)：233–235. (in Chinese)

陈　暄，彭　英，郝　姗，王玉花，房婉萍，张彩丽，黎星辉. 2010. 茶树花粉的离体萌发研究. 江苏农业科学，(6)：233–235.

Clarke A，Desikan R，Hurst R D，Hancock J T，Neill S J. 2008. NO way back：Nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. The Plant Journal，24 (5)：667–677.

Corpas F J，Barroso J B，Carreras A，Quiros M，Leon A M，Romero-Puertas M C，Esteban F J，Valderrama R，Palma J M，Sandalio L M，Gomez M，Del Rio L A. 2004. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. Plant Physiology，136 (1)：2722–2733.

Delledonne M. 2005. NO news is good news for plants. Current Opinion in Plant Biology，8 (4)：390–396.

Dong Li-juan. 2001. Progress in the field of tea cross-breeding research. Journal of Tea Science，21 (1)：7–10. (in Chinese)

董丽娟. 2001. 茶树杂交育种研究进展. 茶叶科学，21 (1)：7–10.

Gould K S，Lamotte O，Klinguer A，Pugin A，Wendehenne D. 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells：A generalized stress response? Plant，Cell & Environment，26 (11)：1851–1862.

He J M，Bai X L，Wang R B，Cao B，She X P. 2007. The involvement of nitric oxide in ultraviolet-B-inhibited pollen germination and tube growth of *Paulownia tomentosa in vitro*. Physiologia Plantarum，131 (2)：273–282.

Hevel J M，Marletta M A. 1994. Nitric-oxide synthase assays. Methods in Enzymology，233：250–258.

Hu X，Neill S J，Tang Z，Cai W. 2005. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. Plant Physiology，137 (2)：663–670.

Lamotte O，Courtois C，Barnavon L，Pugin A，Wendehenne D. 2005. Nitric oxide in plants：The biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. Planta，221 (1)：1 – 4.

Li Cui，Ke Xue，Gong Ming. 2009. Roles of plant nitric oxide synthase in biotic and abiotic stress. Anhui Agricultural Science Bulletin，15 (9)：49 – 51. (in Chinese)

李 翠，柯 学，龚 明. 2009. 一氧化氮合酶（NOS）在植物逆境胁迫中的作用. 安徽农学通报，15 (9)：49 – 51.

Li Xiao-lin. 2005. The influence of low temperature and plant growth regulators on peach pollen germination. Journal of Southwest Agricultural University，27 (4)：526 – 529. (in Chinese)

李晓林. 2005. 低温和植物生长调节剂对桃花粉萌发的影响. 西南农业大学学报，27 (4)：526 – 529.

Liu Y，Jiang H，Zhao Z，An L. 2010. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling-induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. Plant Physiology and Biochemistry，48 (12)：936 – 944.

Murgia I，Concetta de Pinto M，Delledonne M，Soave C，de Gara L. 2004. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation，programmed cell death，and cell redox state in plant cells. Journal of Plant Physiology，161 (7)：777 – 783.

Murphy M E，Noack E. 1994. Nitric oxide assay using hemoglobin method. Methods in Enzymology，233：240 – 250.

Neill S J，Desikan R，Clarke A，Hancock J T. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiology，128 (1)：13 – 16.

Prado A M，Porterfield D M，Feijó J A. 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. Development，131 (11)：2707 – 2714.

Vaknin Y，Eisikowitch D. 2000. Effects of short-term storage on germinability of pistachio pollen. Plant Breeding，119 (4)：347 – 350.

Wang Bai-po，Qian Yin-cai，Zhu Yong-fa，Chen Hua. 1989. The effect of meteorological factors on the pollination，fertilization and fruit setting of the peach. Acta Horticulturae Sinica，(1)：11 – 16，82. (in Chinese)

王白坡，钱银才，朱永法，陈 华. 1989. 气象因素与桃授粉、受精和座果的关系. 园艺学报，(1)：11 – 16，82.

Wang Hua-dong，Tang Hong. 2009. Influence of low temperature on the pollen viability of peach flower. Journal of Anhui Agricultural Sciences，37 (11)：4955 – 4956. (in Chinese)

王华东，唐 红. 2009. 低温对桃花花粉生活力的影响. 安徽农业科学，37 (11)：4955 – 4956.

Wang J W，Zheng L P，Wu J Y，Tan R X. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst，phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide，15 (4)：351 – 358.

Wang Y H，Chen T，Zhang C Y，Hao H Q，Liu P，Zheng M Z，Baluska F，Samaj J，Lin J X. 2009. Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca^{2+} and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. New Phytologist，182 (4)：851 – 862.

Wendehenne D，Durner J，Klessig D F. 2004. Nitric oxide：A new player in plant signalling and defence responses. Current Opinion in Plant Biology，7 (4)：449 – 455.

Wilson I D，Neill S J，Hancock J T. 2007. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. Plant，Cell & Environment，31 (5)：622 – 631.

Xiang Xu，Ou Liang-xi，Qiu Yan-ping，Li Zhi-qiang，Chen Jie-zhen. 2000. Influence of chemical factors on the pollen viability of *Litchi chinensis*. Guangdong Agricultural Sciences，6)：29 – 32. (in Chinese)

向 旭，欧良喜，邱燕萍，李志强，陈洁珍. 2000. 影响荔枝花粉活力的化学因子研究. 广东农业科学，(6)：29 – 32.

Xiao Qiang，Zheng Hai-lei. 2004. Nitric oxide and plant stress response. Plant Physiology Communications，40 (3)：379 – 384. (in Chinese)

肖 强，郑海雷. 2004. 一氧化氮与植物胁迫响应. 植物生理学通讯，40 (3)：379 – 384.

Zhang Shao-ying，Rao Jing-ping，Ren Xiao-lin. 2007. Effects of nitric oxide on respiration and enzymatic activityof cut rose during vase. Acta Horticulturae Sinica，34 (1)：183 – 188. (in Chinese)

张少颖，饶景萍，任小林. 2007. 一氧化氮对瓶插月季呼吸作用及相关酶活性的影响. 园艺学报，34 (1)：183 – 188.

Zhang Yi，Wang Ya-li，Chen Jun-jie. 2003. Effect of low temperature and chemicals on vitality of plum pollen. Journal of Hubei Agricultural College，23 (4)：248 – 250. (in Chinese)

张 义，王亚莉，陈俊杰. 2003. 低温及药剂处理对李花粉生活力的影响. 湖北农学院学报，23 (4)：248 – 250.

Zhao M G，Chen L，Zhang L L，Zhang W H. 2009. Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiology，151 (2)：755 – 767.