

网络出版时间:2019-04-01 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.10.018
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190401.1518.036.html

Ca²⁺ 参与外源 NO 诱导增强枇杷幼苗 抗冻性的信号转导

吴锦程,林授锴,林素英,吴毕莎,王燕瑜,洪雅惠

(莆田学院 环境与生物工程学院,福建 莆田 351100)

【摘 要】【目的】从影响枇杷幼苗 Ca²⁺ 信号通路的角度,分析外源 Ca²⁺、钙离子通道抑制剂和钙调素拮抗剂对低温胁迫下幼苗抗氧化能力的影响,探讨 Ca²⁺ 信号在外源 NO 诱导增强枇杷幼苗抗冻性中的调控机制。【方法】以 2 年生的早钟 6 号枇杷(*Eriobotrya Japonica* Lindl. cv. Zaozhong No. 6)容器苗为试材,采用叶面喷施外源 NO 供体硝普钠(SNP)、氯化钙(CaCl₂)、钙离子通道抑制剂三氯化镧(LaCl₃)和钙调素拮抗剂 N-(6-氨基己基)-5-氯-1-萘磺胺(W7)处理低温胁迫下的枇杷幼苗,试验共设 6 个处理,分别为叶面喷施 SNP 处理(T1)、CaCl₂ + SNP 处理(T2)、LaCl₃ + SNP 处理(T3)、W7 + SNP 处理(T4)、W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)以及叶面喷施 H₂O (对照,CK),研究不同处理对幼苗过氧化氢(H₂O₂)、丙二醛(MDA)和钙调素(CaM)含量及过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的影响,最后对低温胁迫下枇杷叶片各生理指标的相关性进行了分析。【结果】与对照相比,SNP 处理(T1)和 CaCl₂ + SNP 处理(T2)显著促进了叶片细胞 CaM 含量的增加以及 CAT、POD、SOD 和 APX 活性的上升,降低了细胞 H₂O₂ 和 MDA 含量,从而减轻了细胞的膜脂过氧化程度,提高了枇杷幼苗的抗冻性。与对照相比,LaCl₃ + SNP 处理(T3)提高了叶片 MDA 含量,但是叶片 H₂O₂、CaM 含量以及 CAT、POD、SOD 和 APX 活性总体均显著降低。与对照相比,W7 + SNP 处理(T4)、W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)均显著增加了细胞 H₂O₂ 和 MDA 含量,明显降低了叶片细胞 CaM 含量以及 CAT、POD、SOD 和 APX 活性。相关性分析表明,CaM 含量与 CAT、POD、SOD 和 APX 等保护酶活性的相关系数均高于 0.88,呈极显著正相关;而 CaM 含量与 H₂O₂ 和 MDA 含量的相关系数分别为-0.721 和-0.884,呈极显著负相关;4 种保护酶活性与 H₂O₂ 和 MDA 含量之间也呈现极显著负相关。【结论】外源 Ca²⁺ 和 NO 具有协同增强枇杷幼苗抗冻性的诱导效应,而 LaCl₃ 和 W7 对外源 NO 诱导增强枇杷幼苗的抗冻性起阻遏作用,Ca²⁺ 参与了外源 NO 诱导增强枇杷幼苗抗冻性的信号转导。

【关键词】枇杷幼苗;低温胁迫;Ca²⁺;外源 NO 诱导;抗冻性

【中图分类号】S667.3

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2019)10-0146-09

Ca²⁺ involved signal transduction in enhancing frost resistance of loquat seedlings induced by exogenous NO

WU Jincheng, LIN Shoukai, LIN Suying, WU Bisha,
WANG Yanyu, HONG Yahui

(College of Environmental and Biological Engineering, Putian University, Putian, Fujian 351100, China)

Abstract: 【Objective】In this study, mediating loquat seedling signal pathway method was used to analyze the effect of exogenous CaCl₂, Ca²⁺ channel inhibitor and calmodulin antagonist on antioxidant capacity of loquat seedling under low temperature stress. The regulation mechanism of Ca²⁺ signal pathway to frost resistance of loquat seedling induced by exogenous nitric oxide (NO) was also investigated. 【Method】Leaves of two-year-old container seedlings of ‘Zaozhong No. 6’ loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) were

【收稿日期】2018-09-21

【基金项目】福建省自然科学基金项目(2017J01644, 2017J01645);福建省科技计划重点项目(2011N0028)

【作者简介】吴锦程(1965—),男,福建莆田人,教授,主要从事果树生理学研究。

sprayed with sodium nitroprusside (SNP), calcium chloride (CaCl₂), lanthanum chloride (LaCl₃) and N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide (W7) to investigate the effects on contents of H₂O₂, malondialdehyde (MDA) and calmodulin (CaM) and activities of catalase (CAT), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) under low temperature stress. A total of 6 treatments were set in the experiment, including leaf spraying with H₂O (CK), SNP (T1), CaCl₂ + SNP (T2), LaCl₃ + SNP (T3), W7 + SNP (T4), and W7 + LaCl₃ + SNP (T5). 【Result】 SNP (T1) and CaCl₂ + SNP (T2) treatments increased CaM content and activities of CAT, POD, SOD and APX, while reduced contents of H₂O₂ and MDA, thereby decreased membrane lipid peroxidation level and increased cold resistance of loquat seedling. In comparison, LaCl₃ + SNP (T3) treatment increased MDA content of loquat leaves and reduced contents of H₂O₂ and CaM and activities of CAT, POD, SOD and APX. W7 + SNP (T4) and W7 + LaCl₃ + SNP (T5) treatments significantly increased contents of H₂O₂ and MDA and decreased CaM content and activities of CAT, POD, SOD and APX. Correlations of CaM content and protective enzyme activities of CAT, POD, SOD and APX were extremely significant with coefficients of greater than 0.88. Correlations of CaM content with H₂O₂ and MDA were extremely significant and negative with coefficients of -0.721 and -0.884, respectively. There were also significant negative correlations between activities of protective enzymes and contents of H₂O₂ and MDA. 【Conclusion】 Exogenous Ca²⁺ and NO had synergistic enhancing role on loquat seedling frost resistance, while the induction and enhancement of loquat seedling frost resistance by exogenous NO were negatively controlled by LaCl₃ and W7. Ca²⁺ involved in signal transduction in enhancing frost resistance of loquat seedlings induced by exogenous NO.

Key words: loquat seedlings; low temperature stress; Ca²⁺; exogenous NO-induced; frost resistance

枇杷属植物约有 30 多个种类(包括种、变种或变型),其中原产于我国的约 20 种,目前枇杷属植物被广为栽培利用的仅普通枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)一个种,为原产于我国的一种典型亚热带常绿果树,具有丰富的种质资源,栽培品种、品系和优良株系共有 350 多个。低温是影响枇杷产区分布的非生物胁迫因素,枇杷树体、花器和幼果耐受的极限低温分别为-12,-6 和-3℃。我国现有东南沿海产区、华南沿海产区、华中产区和西南高原产区,原产中国的枇杷经不同途径传播到海外,形成了国外产区^[1-4]。东南和华南沿海枇杷产区大多属于亚热带和热带边缘地区,气候温暖湿润,栽培的枇杷多为热带型品种,耐寒性较差,在冬季气温偏低的枇杷冻害严重,尤以在高海拔山区栽培的早钟 6 号枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl. cv. Zaozhong No. 6)品种损失惨重,甚至颗粒无收^[2,4-6]。我国北方气候较为寒冷,自然条件下不适宜枇杷栽培,但近年利用设施栽培技术在北京、营口等部分北方城市因地制宜地发展了小规模枇杷生产。在农业生产中,冻害是一种受害面积广、损失大的严重自然灾害,因此提高枇杷的抗冻性对发展枇杷生产具有十分重要的意义。

抗冻性是植物长期适应低温环境过程中经自然

选择所获得的一种抗冻能力,不同植物种类和品种具有不同的抗冻性,主要取决于植物不同的遗传背景,但植物抗冻性也可通过一些途径得以提高。一氧化氮(nitric oxide, NO)是植物对逆境胁迫防御响应的一种信号分子,参与极端温度、干旱等多种非生物胁迫的防御反应,在提高植物的抗逆性方面发挥重要的作用^[7-9]。研究发现,硝普钠(SNP, 外源 NO 供体)处理可通过提高黑麦草(*Lolium perenne* L.)和棉花(*Gossypium hirsutum* L.)细胞抗氧化系统的酶活性,增强其清除活性氧的能力,缓解低温胁迫对细胞造成的氧化损伤,提高植物耐受低温胁迫的能力^[10-11]。本实验室前期研究报道,适量 SNP 处理可促进枇杷叶片和幼果细胞抗氧化保护酶活性的上升,降低膜脂过氧化程度,提高枇杷的抗冻能力^[12-13]。近年来不少研究报道, Ca²⁺·钙调素(CaM)作为第二信使诱导和调控植物的抗氧化系统,参与逆境胁迫下植物的防御反应^[14-15]。如适量 Ca²⁺处理可显著提高冷胁迫下水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)幼苗超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)等抗氧化系统的酶活性,减缓电解质渗漏率和丙二醛(MDA)含量的增加,提高其抗冷性^[16-17]。吴锦程等^[3]报道 Ca²⁺处理激活了枇杷幼苗过氧化氢酶(CAT)和 SOD 活性,

降低了细胞 MDA 含量,提高了枇杷的抗冻性,表明 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 信号在植物防御低温胁迫的抗氧化反应中发挥了重要的调控作用。虽然外源 NO 和 Ca^{2+} 处理对枇杷抗冻性的调控作用已被证实,但其对低温胁迫响应的调控路径是否存在关联尚不明确。

本试验采用抗冻性较弱的 2 年生早钟 6 号枇杷容器苗叶面喷施 CaCl_2 、钙离子通道抑制剂三氯化镧(LaCl_3 , 以下简称抑制剂)、钙调素拮抗剂 N-(6-氨基己基)-5-氯-1-萘磺胺(W7, 以下简称拮抗剂),从增强和阻碍 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 信使系统转导的角度揭示 Ca^{2+} 在外源 NO 诱导枇杷抗冻性中的调控机理,为枇杷越冬栽培措施的实施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及试验设计

供试材料为生长正常、长势相对一致、2 年生早钟 6 号枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl. cv. Zaozhong No. 6)的本砧嫁接容器苗,由福建省莆田市果树研究所提供。将容器苗随机分为 6 组,参照杨永杰等^[18]和张政委等^[19]的方法,以叶面喷施 SNP 为处理 1(T1), $\text{CaCl}_2 + \text{SNP}$ 为处理 2(T2), $\text{LaCl}_3 + \text{SNP}$ 为处理 3(T3),W7 + SNP 为处理 4(T4),W7 + $\text{LaCl}_3 + \text{SNP}$ 为处理 5(T5),以 5 株容器苗为 1 个重复,每处理重复 3 次,共 15 株,以叶面喷 H_2O 为对照(CK)。上述 SNP、 CaCl_2 、 LaCl_3 和 W7 处理浓度分别为 0.5、5.0、4.0 和 0.5 mmol/L(各加入 1% 的 Tween-20)。喷施方法为:在室温 25℃ 条件下,每天 17:00 给容器苗叶片喷施 1 次至滴液为止,每 2 d 喷 1 次,共喷施处理 3 次。容器苗在药物喷施 24 h 后参照吴锦程等^[12]的方法进行 -3℃ 低温胁迫处理,将上述容器苗置于人工气候室(相对湿度为 70%,光照强度 2 000 lx),通过程序降温至 -3℃ 并保持 6 h,于 25℃ 室温下平衡 12 h 后参照吴锦程等^[3]的方法取样,选取枝条顶端由上而下第 3—5 片叶片进行混合取样,样品经液氮速冻后保存于 -70℃ 冰箱中,待测相关指标。SNP、W7 和 LaCl_3 均购于 Sigma 公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 过氧化氢(H_2O_2)、MDA 和 CaM 含量
 H_2O_2 和 MDA 含量的测定参照邹琦^[20]的方法进行, H_2O_2 含量单位为“ $\mu\text{mol}/\text{g}$ ”,MDA 单位为“ mmol/g ”。CaM 含量测定参照黄号栋等^[21]的酶联免疫法(ELISA)进行,单位为“ $\mu\text{g}/\text{g}$ ”;以上各测定

结果均重复 3 次,取平均值。

1.2.2 保护酶活性 过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照陈建勋等^[22]的方法进行。CAT、POD、SOD 活性均用“U/g”表示,APX 活性用“U/(mg·min)”表示。

1.3 数据处理与分析

采用 Excel 2003 和 SAS 9.0 统计软件进行差异显著性检验和相关性分析并做图,结果均为 3 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片 H_2O_2 含量的影响

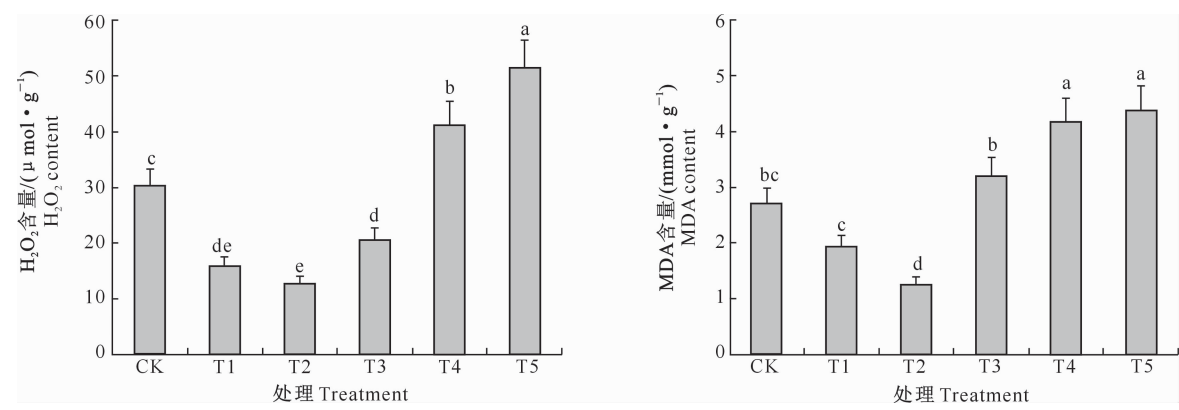
H_2O_2 是植物细胞代谢过程中产生的一种活性氧,低温胁迫会引发细胞 H_2O_2 的过量积累,并导致膜脂过氧化损伤^[23]。由图 1 可见,SNP(T1)、 $\text{CaCl}_2 + \text{SNP}$ (T2)和 $\text{LaCl}_3 + \text{SNP}$ 处理(T3)的枇杷叶片细胞 H_2O_2 含量均显著低于 CK, H_2O_2 含量依次为 $\text{CK} > \text{LaCl}_3 + \text{SNP} > \text{SNP} > \text{CaCl}_2 + \text{SNP}$,说明外源 SNP 或 CaCl_2 处理可有效减少细胞 H_2O_2 的积累, $\text{CaCl}_2 + \text{SNP}$ 处理(T2)对清除细胞 H_2O_2 的作用具有明显的累加效应。 $\text{LaCl}_3 + \text{SNP}$ 处理(T3)枇杷叶片 H_2O_2 含量虽低于 CK,但其 H_2O_2 含量却高于 SNP 处理(T1),说明作为 Ca^{2+} 通道抑制剂的 LaCl_3 在一定程度上抑制了 SNP 处理减少细胞 H_2O_2 积累的生理作用。W7 + SNP 处理(T4)叶片 H_2O_2 含量高于 T1 和 CK,表明 W7 不但抑制 SNP 诱导清除细胞 H_2O_2 的作用,而且促进了叶片细胞 H_2O_2 的积累。W7 + $\text{LaCl}_3 + \text{SNP}$ 处理(T5)叶片细胞 H_2O_2 含量显著高于 T3 和 T4,显示 W7 和 LaCl_3 共同处理对 SNP 所诱导清除细胞 H_2O_2 的作用产生了协同抑制效应。可见 CaCl_2 处理具有增强 SNP 减少低温胁迫下细胞 H_2O_2 积累的正控生理效应,而 W7 和 LaCl_3 则起到了相反的负控作用。

2.2 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片 MDA 含量的影响

MDA 是逆境胁迫下植物细胞内产生氧自由基引发膜脂过氧化的最终产物,其含量与细胞的膜脂过氧化程度呈正相关,即 MDA 含量可直接反映植物遭受逆境伤害的程度^[24-25]。从图 1 可以看出,SNP 处理(T1)的叶片 MDA 含量比 CK 低 28.39%, $\text{CaCl}_2 + \text{SNP}$ 处理(T2)的 MDA 含量显著低于 SNP 处理(T1)和 CK,表明 SNP 处理能有效

降低膜脂的过氧化程度,缓解低温对幼苗的伤害,增强幼苗的抗冻能力,而 CaCl₂ 具有增强 SNP 的生理作用。低温胁迫下,LaCl₃ + SNP(T3)、W7 + SNP(T4)和 W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)的叶片 MDA 含量均高于 CK,MDA 含量依次为 W7 + LaCl₃ + SNP>W7 + SNP>LaCl₃ + SNP>CK,且 LaCl₃ + SNP(T3)和 W7 + SNP 处理(T4)的叶片细胞 MDA 含量也显著高于 SNP 处理(T1),预示着抑制剂或拮抗剂处理不但抑制了 SNP 对幼苗抗氧化性的正

控诱导效应,而且加重了低温对叶片细胞的膜脂过氧化损伤。W7 + LaCl₃ + SNP(T5)处理的叶片 MDA 含量高于 W7 + SNP(T4)和 LaCl₃ + SNP 处理(T3),说明抑制剂与拮抗剂组合处理对叶片细胞的膜脂过氧化损伤具有叠加效应,进一步证实了 SNP 降低膜脂过氧化的作用可被抑制剂或拮抗剂所抑制。W7 + SNP 处理(T4)的幼苗叶片 MDA 含量显著高于 LaCl₃ + SNP 处理(T3),表明 W7 对 SNP 诱导增强幼苗抗氧化性的抑制作用更强。



T1. SNP; T2. CaCl₂ + SNP; T3. LaCl₃ + SNP; T4. W7 + SNP; T5. W7 + LaCl₃ + SNP
图柱上标不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同
Different lowercase letters on indicate significant difference at P<0.05 level. The same below

图 1 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片 H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

Fig.1 Effect of different treatments on H₂O₂ and MDA contents of loquat leaves under low temperature stress

2.3 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片 CaM 含量的影响

CaM 作为细胞 Ca²⁺ 信号的主要感受器而成为重要的信号蛋白,在逆境胁迫中起到转导 Ca²⁺ 信号的作用,在参与调控细胞多种生理过程中发挥着重要作用。

从图 2 可以看出,低温胁迫下经 SNP 处理(T1)的叶片细胞 CaM 含量比 CK 高 84.33%,两者差异达显著水平(P<0.05),CaCl₂ + SNP 处理(T2)的 CaM 含量高于 SNP 处理(T1)和 CK,差异达显著水平(P<0.05),显然 SNP 处理诱导了低温胁迫下叶片细胞 CaM 的生物合成,而 CaCl₂ 则进一步促进了叶片细胞 CaM 的生成。SNP 处理(T1)的叶片细胞 CaM 含量比 T3、T4 和 T5 处理高 96.81%以上,差异达极显著水平(P<0.01),而 W7 + SNP 处理(T4)的叶片细胞 CaM 含量高于 W7 + LaCl₃ + SNP(T5)和 LaCl₃ + SNP 处理(T3),由此可以看出,钙离子通道抑制剂 LaCl₃ 对叶片细胞的 CaM 含量影响较大,但 T3 与 T5 处理叶片间的 CaM 含量差异不显著。

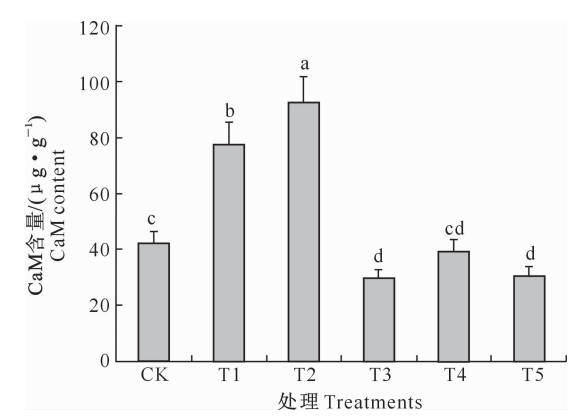


图 2 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片 CaM 含量的影响
Fig.2 Effect of different treatments on CaM content of loquat leaves under low temperature stress

2.4 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片抗氧化保护酶活性的影响

逆境条件下,植物细胞内的活性氧(ROS)大量产生并引发膜脂过氧化,细胞膜结构遭受破坏,而胞内 CAT、POD、SOD 和 APX 等抗氧化酶系可清除 ROS,减轻因逆境引起的膜脂过氧化损伤,起到保护膜系统的作用,提高植物的抗逆性^[26-28]。由图 3 可

以看出,在本试验中,低温胁迫下 SNP 处理(T1)的叶片 CAT 活性显著高于 CK,显示了 SNP 处理具有诱导低温胁迫下枇杷叶片 CAT 活性上升的生理效应;CaCl₂ + SNP 处理(T2)的叶片 CAT 活性显著高于 SNP 处理(T1),说明 CaCl₂ 的使用增强了 SNP 激活叶片 CAT 活性的作用。LaCl₃ + SNP (T3)、W7 + SNP (T4) 和 W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)的叶片 CAT 活性均显著低于 CK,但 3 种处理

间叶片 CAT 活性差异不明显($P>0.05$),说明抑制剂或拮抗剂对低温胁迫下枇杷叶片细胞 CAT 活性起抑制作用,且抑制剂与拮抗剂对 CAT 活性的下行调控差异并不明显。SNP 处理(T1)的叶片 CAT 活性高于 LaCl₃ + SNP(T3)和 W7 + SNP 处理(T4) 26.43%以上,可以看出 SNP 激活叶片细胞 CAT 活性的生理功能被抑制剂或拮抗剂所抑制。

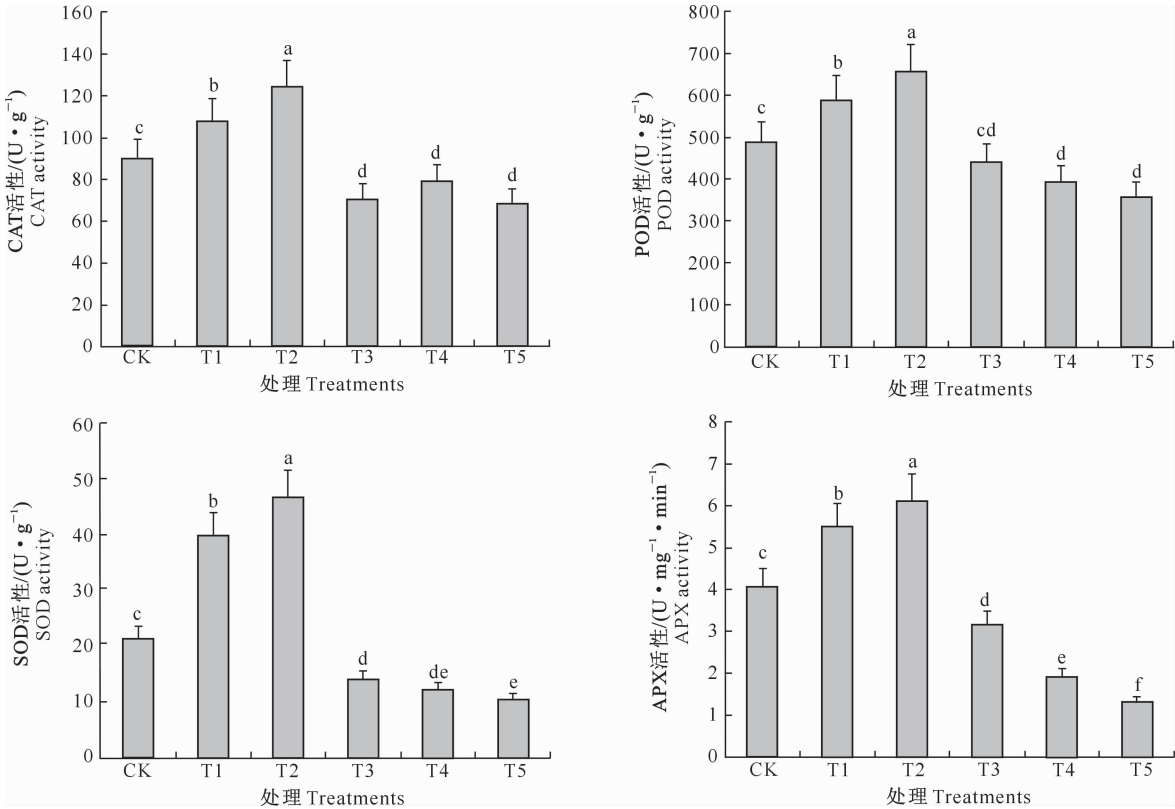


图 3 不同处理对低温胁迫下枇杷叶片抗氧化保护酶活性的影响

Fig. 3 Effect of different treatments on protective enzyme activities of loquat leaves under low temperature stress

如图 3 所示,低温胁迫下 SNP(T1)和 CaCl₂ + SNP 处理(T2)的叶片 POD 活性显著高于 CK,而 CK 叶片的 POD 活性高于抑制剂或拮抗剂处理的 LaCl₃ + SNP(T3)、W7 + SNP(T4)和 W7 + LaCl₃ + SNP(T5),说明 SNP 处理诱导了低温胁迫下幼苗叶片 POD 活性的上升,而抑制剂或拮抗剂处理则对叶片 POD 活性产生抑制作用。抑制剂与拮抗剂共同处理,即 W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)的叶片 POD 活性低于 LaCl₃ + SNP(T3)和 W7 + SNP 处理(T4),CaCl₂ + SNP 处理(T2)的叶片 POD 活性高于 SNP 处理(T1),说明 CaCl₂ 与 SNP 协同促进低温胁迫下叶片 POD 活性的上升,抑制剂和拮抗剂在阻碍 SNP 诱导叶片 POD 活性上升的生理效应方面产生了叠加效应。

由图 3 可见,SNP 处理(T1)叶片 SOD 活性显著高于 CK ($P<0.05$),而 CaCl₂ + SNP 处理(T2)叶片 SOD 活性显著高于 SNP 处理(T1),表明 CaCl₂ 和 SNP 对低温胁迫下叶片 SOD 活性具有激活作用,使细胞内活性氧得到及时清除,提高了幼苗的抗氧化性。低温胁迫下,LaCl₃ + SNP(T3)、W7 + SNP(T4)和 W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)的叶片 SOD 活性极显著低于 SNP 处理(T1) ($P<0.01$),其诱因在于以上 3 个组合处理使用抑制剂或拮抗剂对幼苗进行了处理,说明抑制剂或拮抗剂对 SNP 激活低温胁迫下叶片 SOD 活性的调控作用具有较为强烈的抑制作用。W7 + LaCl₃ + SNP 处理(T5)的叶片 SOD 活性低于 LaCl₃ + SNP(T3)和 W7 + SNP 处理(T4),表明 W7 与 LaCl₃ 共同处理对叶片 SOD

的活性起协同抑制作用。W7+SNP 处理(T4)的叶片 SOD 活性低于 LaCl₃+SNP 处理(T3),表明拮抗剂 W7 对 SOD 活性的抑制作用略强,但未表现出显著的差异性。综上可知,抑制剂或拮抗剂阻断了 SNP 激活低温胁迫下叶片 SOD 活性的诱导效应。

由图 3 可见,低温胁迫下 SNP 处理(T1)幼苗叶片 APX 活性高于 CK,而经抑制剂或拮抗剂处理的 T3、T4 和 T5 叶片细胞 APX 活性却显著低于 CK ($P<0.05$),表明 SNP 处理提高了低温胁迫下叶片细胞 APX 的活性,说明抑制剂或拮抗剂处理对叶片细胞 APX 活性具有抑制作用。T2 处理叶片细胞 APX 活性显著高于 T1,表明 CaCl₂ 处理增强了 SNP 对 APX 活性的调控作用。W7+LaCl₃+SNP 处理(T5)的幼苗叶片 APX 活性显著低于 LaCl₃+SNP(T3)和 W7+SNP 处理(T4),表明 W7+LaCl₃ 共同处理对 SNP 诱导叶片细胞 APX 活性上升具有明显的协同抑制作用。W7+SNP 处理(T4)的叶片

细胞 APX 活性显著低于 LaCl₃+SNP 处理(T3),显示了 SNP 处理激活叶片细胞 APX 活性的正控效应不但为抑制剂 LaCl₃ 和拮抗剂 W7 所阻遏,而且它们对细胞 APX 活性的遏制作用存在差异,其中 W7 对细胞 APX 活性的遏制作用更强。

2.5 低温胁迫下枇杷叶片各生理指标的相关性

由表 1 可见,低温胁迫下枇杷叶片各生理指标之间相关系数很高,且均为极显著相关关系($P<0.01$)。其中,CaM 含量与 CAT、POD、SOD 和 APX 等保护酶活性的相关系数均高于 0.88,为极显著正相关。而 CaM 含量与 H₂O₂ 和 MDA 含量的相关系数分别为-0.721 和-0.884,为极显著负相关。此外,4 种保护酶活性与 H₂O₂ 和 MDA 含量之间也呈现极显著负相关。这表明 Ca²⁺ 和 NO 信号可以通过协同作用调节 CaM 含量,进而调控低温胁迫下枇杷幼苗的抗氧化能力。

表 1 低温胁迫下枇杷叶片各生理指标的相关性

Table 1 Correlations of different physiological indexes of loquat leaves under low temperature stress

指标 Index	CaM 含量 CaM content	H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	MDA 含量 MDA content	CAT 活性 CAT activity	POD 活性 POD activity	SOD 活性 SOD activity	APX 活性 APX activity
CaM 含量 CaM content	1.000						
H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	-0.721**	1.000					
MDA 含量 MDA content	-0.884**	0.912**	1.000				
CAT 活性 CAT activity	0.980**	-0.735**	-0.919**	1.000			
POD 活性 POD activity	0.943**	-0.880**	-0.989**	0.963**	1.000		
SOD 活性 SOD activity	0.983**	-0.803**	-0.949**	0.977**	0.983**	1.000	
APX 活性 APX activity	0.889**	-0.913**	-0.996**	0.988**	0.988**	0.952**	1.000

注: ** 表示在 $P<0.01$ 水平上显著相关。
Note: ** indicates significant at $P<0.01$ level.

3 讨 论

低温胁迫导致植物体细胞内 H₂O₂ 等活性氧(ROS)过量积累,加剧膜脂的过氧化损伤并生成 MDA,MDA 含量是衡量细胞遭受低温伤害程度的重要指标,然而 CAT、POD、SOD 和 APX 是 ROS 清除途径中的重要酶或关键酶,也是植物体内抗氧化酶系统清除自由基以抵御低温胁迫的自我保护响应机制之一^[29-30]。植物胞内 NO 信号分子在响应不同环境胁迫中起重要的调控作用,缓解逆境条件下的氧化胁迫伤害,适宜的外源 NO 处理能够增强植物对逆境的抗性^[31-32]。马向丽等^[10]报道,适宜的外源 NO 处理增强了低温胁迫下黑麦草(*Lolium perenne* L.)幼苗 SOD、CAT 和 POD 保护酶活性,提高了黑麦草的抗寒性。本实验室前期的研究发现,外源 NO 和 CaCl₂ 处理可诱导枇杷幼果 SOD、

CAT、POD 和 APX 保护酶活性上升,减少细胞 H₂O₂ 含量,降低膜脂的过氧化程度,提高枇杷幼果的抗寒能力^[12]。本试验中,采用外源 SNP 处理(T1)低温胁迫下的枇杷幼苗,提高了叶片 CAT、POD、SOD 和 APX 活性,降低了 H₂O₂ 和 MDA 含量,与 SNP 处理(T1)相比,CaCl₂+SNP 处理(T2)则显著增强了上述幼苗的抗氧化应激活性。枇杷作为原产于亚热带的植物种类,对温度胁迫具有敏感性,低温胁迫可能通过猝发活性氧爆发并因此诱发细胞的防御反应,而外源 NO 处理则通过诱导增强细胞的抗氧化酶活性,及时清除活性氧,减轻细胞膜的氧化伤害,提高幼苗适应低温的能力,CaCl₂ 在 SNP 诱导增强低温胁迫下枇杷幼苗抗氧化性的过程中起正向调控作用。

Ca²⁺ 和 CaM 都是 Ca²⁺·CaM 信号传导途径的信号组分,Ca²⁺ 与 CaM 结合是该信号通路调控的

第一步, Ca^{2+} 或 CaM 含量的变化影响 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 信号系统对胞内靶蛋白活性和基因表达的调控作用。 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 信号系统参与低温胁迫下植物抗氧化酶活性的调控作用已被许多研究所证实^[3,33-37]。有报道显示, NO 能使胞外 Ca^{2+} 内流和/或胞内钙库释放 Ca^{2+} , 从而引起细胞质内 Ca^{2+} 浓度升高^[38]。桑建荣等^[39]曾报道, 外源 NO 提高了水分胁迫下玉米叶片细胞 CaM 的含量和 CaM1 基因的表达。黄玉婷等^[40]研究认为, LaCl_3 和 W7 抑制了低温胁迫下茶树 (*Camellia sinensis* L.) 的 CaM 基因表达, CaM 基因表达量与植物的抗寒性相关。本试验结果显示, 外源 SNP 处理提高了低温胁迫下枇杷叶片的 CaM 含量, 可能是由于 NO 促使胞外 Ca^{2+} 内流和/或胞内钙库释放 Ca^{2+} , 导致细胞质内 Ca^{2+} 浓度升高, 启动 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 信号系统对胞内 CAT、POD、SOD 和 APX 靶酶活性和 CaM 基因表达的正向调控作用, 细胞 CaM 基因表达量上调, 激活了细胞 CAT、POD、SOD 和 APX 保护酶的活性, 增强了幼苗的抗氧化能力, 提高了幼苗的抗冻性。 CaCl_2 与 SNP 共同处理 (T2) 对枇杷幼苗所产生的叠加效应, 可能与其外源 CaCl_2 处理进一步提高胞质 Ca^{2+} 浓度有关, 而 LaCl_3 与 SNP 共同处理抑制了 SNP 所诱导的生理效应, 可能是作为钙离子通道抑制剂, LaCl_3 阻碍了胞外 Ca^{2+} 内流和内源钙库 Ca^{2+} 的释放, 抑制了胞质内 Ca^{2+} 浓度的增加所致。由此可见, CaCl_2 和 LaCl_3 分别通过增加和减少胞质内 Ca^{2+} 浓度的方式参与 SNP 对低温胁迫下枇杷幼苗抗氧化性的调控。W7 作为钙调素激酶拮抗剂能够阻止 Ca^{2+} 与 CaM 的结合, 阻碍 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合体的形成, 因此, W7 与 SNP 共同处理削弱了枇杷幼苗的抗氧化能力, 加剧了低温对幼苗的损伤, 可能与其抑制 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 信号系统对胞内保护酶活性和 CaM 基因表达的正向调控有关。W7 + LaCl_3 与 SNP 共同处理对 SNP 诱导的生理效应产生协同抑制作用, 与胞质 Ca^{2+} 浓度增加和 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合体形成受阻有关, 同时也进一步证实了 Ca^{2+} 和 NO 信号共同调节了低温胁迫下枇杷幼苗的抗氧化能力。

4 结 论

外源 SNP 处理能诱导增强枇杷幼苗叶片细胞抗氧化酶的活性, 及时清除活性氧, 减轻细胞膜的氧化伤害, 提高幼苗适应低温的能力。外源 CaCl_2 与 SNP 共同处理显著增强了上述幼苗的抗氧化应激

活性。外源钙离子通道抑制剂 LaCl_3 、外源钙调素拮抗剂 W7 分别与 SNP 共同处理均抑制了 SNP 所诱导的生理效应, 加剧了低温对幼苗的损伤。外源 W7、 LaCl_3 与 SNP 共同处理对 SNP 诱导的生理效应具有协同抑制作用。由此可见, Ca^{2+} 参与了外源 NO 诱导增强枇杷幼苗抗冻性的信号转导。

[参考文献]

- [1] 邱武陵, 章恢志. 中国果树志: 龙眼枇杷卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1996: 100-103.
Qiu W L, Zhang H Z. China fruit trees: Longan and loquat volume [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1996: 100-103.
- [2] 邱武陵. 福建果树 50 年 [M]. 福建福州: 福建教育出版社, 2000: 372-379.
Qiu W L. In the past 50 years of Fujian fruits [M]. Fuzhou, Fujian: Fujian Education Press, 2000: 372-379.
- [3] 吴锦程, 陈 宇, 吴毕莎, 等. 钙处理对低温胁迫下枇杷幼苗 Ca^{2+} -ATPase 活性和膜脂过氧化水平的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(2): 121-128.
Wu J C, Chen Y, Wu B S, et al. Effects calcium on Ca^{2+} -ATPase activity and lipid peroxidation level of loquat seedling under low temperature stress [J]. Journal of Northwest Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2016, 44(2): 121-128.
- [4] 黄金松. 枇杷栽培新技术 [M]. 福建福州: 福建科学技术出版社, 2000: 25-27.
Huang J S. New technology of loquat culture [M]. Fuzhou, Fujian: Fujian Science and Technology Press, 2000: 25-27.
- [5] 谢钟琛, 李 健. 早钟 6 号枇杷幼果冻害温度界定及其栽培适宜区划 [J]. 福建果树, 2006(1): 7-11.
Xie Z C, Li J. Freezing injury temperature limit and division of optimum cultivation area of 'Zaozhong No. 6' loquat young fruits [J]. Fujian Fruits, 2006(1): 7-11.
- [6] 张夏萍, 许伟东, 郑诚乐. 枇杷冻害及防范研究进展 [J]. 福建果树, 2007(3): 28-31.
Zhang X P, Xu W D, Zheng C L. The research progress of freezing injury and prevention of loquat [J]. Fujian Fruits, 2007(3): 28-31.
- [7] Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F, et al. Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress [J]. Frontier in Plant Science, 2015, 6: 977.
- [8] Gonorazky G, Distéfano A M, García-Mata C, et al. Phospholipases in nitric oxide-mediated plant signaling [M]. Berlin: Springer, 2014: 135-158.
- [9] Khan M N, Mobin M, Mohammad F, et al. Nitric oxide action in abiotic stress responses in plants [M]. Berlin: Springer, 2015: 21-41.
- [10] 马向丽, 魏小红, 龙瑞军, 等. 外源一氧化氮提高一年生黑麦草抗冷性机制 [J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1269-1274.

- Ma X L, Wei X H, Long R J, et al. Studies on mechanism of enhancing the chilling resistance of annual ryegrass by exogenous nitric oxide [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (6): 1269-1274.
- [11] 杨美森,王雅芳,干秀霞,等. 外源一氧化氮对冷胁迫下棉花幼苗生长、抗氧化系统和光合特性的影响 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(15): 3058-3067.
- Yang M S, Wang Y F, Gan X X, et al. Effects of exogenous nitric oxide on growth, antioxidant system and photosynthetic characteristics in seedling of cotton cultivar under chilling injury stress [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45 (15): 3058-3067.
- [12] 吴锦程,陈伟建,蔡丽琴,等. 外源 NO 对低温胁迫下枇杷幼果抗氧化能力的影响 [J]. *林业科学*, 2010, 46(9): 73-78.
- Wu J C, Chen W J, Cai L Q, et al. Effects of exogenous nitric oxide on anti-oxidation capacities in young loquat fruits under low temperature stress [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2010, 46 (9): 73-78.
- [13] 吴锦程,陈建琴,梁杰,等. 外源一氧化氮对低温胁迫下枇杷叶片 AsA-GSH 循环的影响 [J]. *应用生态学报*, 2009, 20(6): 1395-1400.
- Wu J C, Chen J Q, Liang J, et al. Effects of exogenous NO on ascorbate-glutathione cycle in loquat leaves under low temperature stress [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20 (6): 1395-1400.
- [14] Bonza M C, De Michelis M I. The plant Ca²⁺-ATPase repertoire: biochemical features and physiological functions [J]. *Plant Biology (Stuttg)*, 2011, 13(3): 421-430.
- [15] Anireddy S N, Gul S, Helena C, et al. Coping with stresses: roles of calcium and calcium/calmodulin-regulated gene expression [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 2010-2032.
- [16] 梁颖,王三根. Ca²⁺对低温下水稻幼苗膜的保护作用 [J]. *作物学报*, 2001, 27(1): 59-64.
- Liang Y, Wang S G. The protective function of Ca²⁺ on the membrane of rice seedling under low temperature stress [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(1): 59-64.
- [17] 王芳,王丹丹,赵娟,等. 钙对低温胁迫下玉米幼苗氧化损伤的保护作用 [J]. *干旱地区农业研究*, 2014, 1(1): 155-160.
- Wang F, Wang D D, Zhao J, et al. Positive effect of calcium on oxidative damage in maize seedling under chilling stress [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2014, 1(1): 155-160.
- [18] 杨永杰,杨雪芹,张彩霞,等. 干旱胁迫下 NO 对水稻日本晴叶片生理特性的影响 [J]. *中国水稻科学*, 2015, 29(1): 65-72.
- Yang Y J, Yang X Q, Zhang C X, et al. Effects of nitric oxide on drought stress-induced physiological characteristics in leaves of nipponbare (*Oryza sativa* L.) [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2015, 29(1): 65-72.
- [19] 张政委,索琳格,吴佩,等. Ca²⁺参与外源 NO 增强低温胁迫下黄瓜幼苗叶片抗氧化能力 [J]. *核农学报*, 2018, 32(3): 600-608.
- Zhang Z W, Suo L G, Wu P, et al. Ca²⁺ involved in antioxidant enzymes activities of cucumber seedling leaves enhanced by exogenous nitric oxide under low temperature stress [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32 (3): 600-608.
- [20] 邹琦. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 72-174.
- Zou Q. The experimental guide for plant physiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 72-174.
- [21] 黄号栋,杨静,龚明. 用磷酸二酯酶定量检测植物钙调素方法的改进 [J]. *植物生理学报*, 2003, 39(2): 156-160.
- Huang H D, Yang J, Gong M. Improved quantitative assay of plant calmodulin by phosphodiesterase [J]. *Plant Physiology Communications*, 2003, 39(2): 156-160.
- [22] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 119-127.
- Chen J X, Wang X F. The experimental guide for plant physiology [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2002: 119-127.
- [23] Okuda T, Matsuda Y, Yamanaka A, et al. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold tolerance [J]. *Plant Physiology*, 1991, 97(3): 1265-1267.
- [24] 高述民,程朋军,郭惠红,等. 日本桃叶珊瑚的冷驯化及抗寒机制研究 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(12): 2113-2119.
- Gao S M, Cheng P J, Guo H H, et al. Study on cold acclimation and freezing-tolerance mechanism of *Aucuba japonica* cv. Variegata [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(12): 2113-2119.
- [25] 王腾飞,裴玉贺,郭新梅,等. 3 个玉米品种苗期耐寒性鉴定 [J]. *核农学报*, 2017, 31(4): 803-808.
- Wang T F, Pei Y H, Guo X M, et al. Identification of the cold tolerance of three maize varieties in the seedling stage [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31 (4): 803-808.
- [26] 王树刚,王振林,王平,等. 不同小麦品种对低温胁迫的反应及抗冻性评价 [J]. *生态学报*, 2011, 31(4): 1064-1072.
- Wang S G, Wang Z L, Wang P, et al. Evaluation of wheat freezing resistance based on the responses of the physiological indices to low temperature stress [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(4): 1064-1072.
- [27] 张素勤,程智慧,耿广东. 低温胁迫对茄子幼苗生理特性的影响 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 32(4): 393-396.
- Zhang S Q, Cheng Z H, Geng G D. Effect of low temperature on eggplant-seedling physiological characteristics [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2006, 32(4): 393-396.
- [28] Conrath U, Chen Z, Rieglano J R, et al. Two inducers of plant defense responses, 2, 6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(16): 7143-7147.
- [29] Yang S H, Wang L J, Li S H, et al. The effects of UV-B radiation on photosynthesis in relation to photosystem II photochemistry, thermal dissipation and antioxidant defenses in

- winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings at different growth temperatures [J]. *Functional Plant Biology*, 2007, 34: 907-917.
- [30] Abuzar H, Mahmood G, Reza F G, et al. Olive (*Olea europaea* L.) freezing tolerance related to antioxidant enzymes activity during cold acclimation and non acclimation [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(12): 3231-3241.
- [31] Garcia-Mata C, Lamattina L. Absciscic acid, nitric oxide and stomatal closure: is nitrate reductase one of the missing links [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8: 20-26.
- [32] Neill S J, Desikan R, Hancock J T. Nitric oxide signaling in plants [J]. *New Phytologist*, 2004, 159: 11-35.
- [33] 荣俊冬, 刘学琴, 张迎辉, 等. 低温胁迫下 Ca^{2+} -CaM 信使系统对三尖杉幼苗保护酶活性的影响 [J]. *西南林业大学学报*, 2012, 32(5): 33-36.
- Rong J D, Liu X Q, Zhang Y H, et al. Effects of Ca^{2+} -CaM messenger system on the protective enzyme activity of *Cephalotaxus fortunei* seedlings under low temperature stress [J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2012, 32(5): 33-36.
- [34] 宗会, 刘娥娥, 郭振飞, 等. Ca^{2+} · CaM 信使系统与水稻幼苗抗逆性研究初报 [J]. *华南农业大学学报*, 2000, 21(1): 63-67.
- Zong H, Liu E E, Guo Z F, et al. Preliminary report relationship between Ca^{2+} · CaM messenger system and stress resistance of rice seedling [J]. *Journal of South China Agriculture University*, 2000, 21(1): 63-67.
- [35] 高洪波, 陈贵林. 钙调素拮抗剂与 Ca^{2+} 对茄子幼苗抗冷性的影响 [J]. *园艺学报*, 2002, 29(3): 243-246.
- Gao H B, Chen G L. The effect of calmodulin antagonist and calcium on chilling resistance of eggplant seedling [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29(3): 243-246.
- [36] 林善枝, 蔡世英, 陈晓敏. 低温锻炼对香蕉幼苗钙调蛋白含量及其可能调节酶类活性的影响 [J]. *热带作物学报*, 2001, 22(4): 29-34.
- Lin S Z, Cai S Y, Chen X M. Effect of cold acclimation on calmodulin content and its regulative enzymes activities in banana seedlings [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2001, 22(4): 29-34.
- [37] Lin S Z, Zhang Z Y, Lin Y Z, et al. The role of calcium and calmodulin in freezing-induced freezing resistance of *Populus tomentosa* cuttings [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(1): 59-68.
- [38] Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, et al. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40: 1369-1376.
- [39] 桑建荣, 蒋明义, 陈永昌. 水分胁迫下玉米叶片中一氧化氮与钙和钙调素的相互作用 [J]. *南京农业大学学报*, 2010, 33(5): 111-115.
- Sang J R, Jiang M Y, Chen Y C. Interplay between nitric oxide and calcium/calmodulin in maize leaves (*Zea mays* L.) exposed to water stress [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33(5): 111-115.
- [40] 黄玉婷, 钱文俊, 王玉春, 等. 茶树钙调素基因 *CsCaMs* 的克隆及其低温胁迫下的表达分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(5): 906-913.
- Huang Y T, Qian W J, Wang Y C, et al. Molecular cloning and expression of CaM family gene *CsCaMs* under cold stress in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(5): 906-913.