

Ca²⁺对冷胁迫柑橘离体叶片的相关生理生化指标的影响

张建霞^{1,2}, 李新国¹, 杨波², 孙中海^{1*}

(1. 华中农业大学柑橘研究所, 武汉 430070; 2. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 研究了不同浓度的外源 Ca²⁺ 对柑橘离体叶片抗寒性的影响。结果表明: 10~20 mmol/L Ca²⁺ 处理能够增加柑橘可溶性糖和可溶性蛋白质的含量, 提高 SOD 和 POD 的活性, 同时减少膜质过氧化物丙二醛(MDA)的积累, 从而提高柑橘的抗寒性。

关键词: 钙离子; 柑橘; 抗寒性

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)05-0470-05

Effect of Ca²⁺ on the Correlative Physiological and Biochemical Index of Citrus Detached Leafs under Cold Stress

ZHANG Jian-Xia^{1,2}, LI Xin-Guo¹, YANG Bo², SUN Zhong-Hai^{1*}

(1. Citrus Research Institute of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: The effect of different Ca²⁺ concentration on cold-resistance of the detached leafs of citrus was studied. The result showed that the treatment of 10—20 mmol/L Ca²⁺ could increase the soluble sugar and protein content, enhance the activities of SOD and POD and reduce the MDA accumulation. The results indicated that Ca²⁺ would increase the cold resistance of citrus leaves.

Key words: Calcium ion; Citrus; Cold resistance

Ca²⁺不仅是植物生长发育所必需的一种大量元素,而且对植物细胞的结构和生理功能也有重要的作用,钙离子还是植物细胞内最重要的第二信使,目前已经发现多种刺激因素,包括机械刺激(触动和风)、低温、红光、植物激素、真菌激发子、缺氧、水分胁迫等,都使用细胞内钙离子作为第二信使来调节植物生长、发育、抗逆等生理反应^[1]。柑橘是热带、亚热带地区的多年生常绿果树之一,而周期性的冻害严重影响了柑橘的生产和发展。建国以来发生的几次较大冻害,使我国柑橘产业受到严重影响^[2]。如何有效地提高柑橘抗寒性,降低冻害造成的损失,是摆在我们面前的一个重大问题。在茄子、水稻、油菜、香蕉、绿玉树扦插苗^[3-7]等植物上已经证明喷施 Ca²⁺

能提高植物抗寒性,而对田间多年生木本作物、特别是柑橘的报道甚少。我们通过喷施不同浓度的 CaCl₂,研究其对柑橘抗寒性的影响,旨在寻找合适的钙离子浓度,为提高柑橘抗寒能力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验在华中农业大学成年柑橘园进行,试材选用抗寒性强的宜昌橙(*Citrus ichangensis* Swingle)、抗寒性中等的国庆一号(*C. unshiu* Tanaka cv. Guoqing No. 1)和抗寒性较差的朋娜脐橙(*C. sinensis* Osbeck cv. Skagges Bonnaza),这3个供试品种生长基本一致,正常结果,常规管理水平,树冠外围

收稿日期:2005-01-10,修回日期:2005-05-16。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070528)。

作者简介:张建霞(1979—),女,硕士研究生,主要从事柑橘育种及生理生化的研究。

* 通讯作者(E-mail: sunzhonghai@mail.hzau.edu.cn)。

无病虫害。

选取外围生长健康,长势基本一致的春梢,于2003年11月连续4d在晴朗无风的下午5:00分别用5、10、20、25、30 mmol/L的 CaCl_2 (国产分析纯)溶液均匀喷施叶片,直至叶片有明显水珠滴落,同时每种处理加1% Tween-20,对照喷蒸馏水。第5d剪下枝条,用石蜡封住枝条伤口。放在 -5°C 低温下,24h后用自来水、蒸馏水洗净,再用滤纸擦干叶片。取第三或第四叶片备用。

1.2 方法

可溶性糖含量的测定 采用蒽酮比色法^[8]测定可溶性糖含量,以葡萄糖作标准曲线,避开叶片主脉,剪取0.30 g,放入10 mL具塞刻度试管中,加入10 mL蒸馏水,于沸水中提取3次,每次30 min,将提取液过滤到50 mL容量瓶中,反复漂洗试管及残渣,最后定容至刻度,即得到可溶性糖提取液。

酶液的提取 避开叶片主脉,剪取叶片0.50 g,加入6 mL 0.05 mmol/L pH 7.8磷酸缓冲液(含有1% PVP 聚乙烯吡咯),冰浴研磨后,在 4°C 、9 500 g离心40 min。收集上清液即为酶液。

生化指标的测定 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法^[8]测定。以牛血清白蛋白(BSA)作标准曲线。吸取上述粗酶液0.1 mL,加水0.9 mL,加入5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,充分混合,放置2 min后在595 nm测定吸光度。超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[8]测定,以抑制NBT光化还原50%为一个酶活性单位。丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[9]。过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚氧化法测定^[10],以每分钟内 A_{470} 变化0.01为一个过氧化物酶活性单位,总反应时间为2 min,每隔30 s读取一次数据。

以上各指标测定时,重复3次。数据采用SAS程序统计,显著性差异分析采用LSD/Duncan分析。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片可溶性糖含量、可溶性蛋白含量的影响

喷施一定浓度的外源 Ca^{2+} 后,提高了柑橘叶片可溶性糖含量。随处理 Ca^{2+} 浓度的增加,可溶性糖含量也随之增加,说明高浓度的 Ca^{2+} 对可溶性糖的积累具有很大的促进作用,进而提高其抗寒性(图1)。低温胁迫下,一定浓度的 Ca^{2+} 处理可增加柑橘叶片可溶性蛋白质含量,且随着 Ca^{2+} 浓度增加,叶

片可溶性蛋白质含量呈先上升后下降趋势,国庆一号在喷施10 mmol/L Ca^{2+} 时可溶性蛋白质含量最高,随后慢慢下降;而朋娜脐橙和宜昌橙在喷施20 mmol/L Ca^{2+} 时含量最高,随后下降(图2)。结果说明抗寒性不同的柑橘品种,外源 Ca^{2+} 对刺激可溶性蛋白合成的强度并不一致。

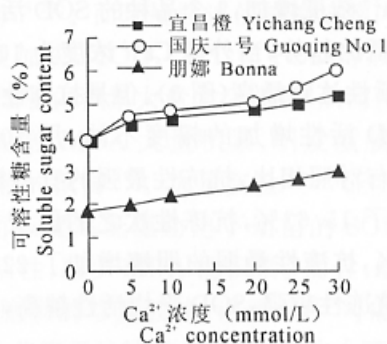


图1 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片可溶性糖含量的影响

Fig. 1 Effect of Ca^{2+} treatment on content of soluble sugar in citrus leaves under low temperature

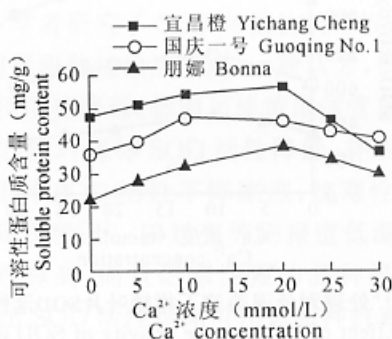


图2 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片可溶性蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of Ca^{2+} treatment on content of soluble protein in citrus leaves under low temperature

但是,抗冻性不同的柑橘,其可溶性糖、可溶性蛋白含量增加的幅度不同。抗冻性最强的宜昌橙可溶性糖含量增加的幅度最低,抗冻性最弱的朋娜脐橙增加的幅度最大。例如30 mmol/L Ca^{2+} 处理与对照相比,朋娜脐橙增加了39.24%,国庆一号温州蜜柑增加了34.11%,宜昌橙增加了24.32%(图1)。这说明3种抗冻性不同的柑橘品种在低温胁迫下可溶性糖的合成对外源 Ca^{2+} 的敏感度并不相同,抗冻性越弱,敏感性就越强,反之,敏感性就越弱。同样,在可溶性蛋白质含量上,与对照比较,抗冻性最强的宜昌橙增加的幅度最低,仅为14.59%;抗冻性最弱的朋娜脐橙增加的幅度最大,增加了40.12%(图2)。这说明3种抗寒性不同的柑橘在低温胁迫下可溶性蛋白的合成对外源 Ca^{2+} 的作用的敏感度有差异,抗冻性越弱,敏感

性就越强,反之,敏感性就越弱。

2.2 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片 SOD 活性、POD 活性的影响

SOD 是膜脂过氧化防御系统的主要保护酶,在维持膜结构完整性等方面起重要作用^[11]。低温胁迫下,一定浓度 Ca^{2+} 处理可增加柑橘叶片 SOD 活性,随外源 Ca^{2+} 浓度增加,3 个品种的 SOD 活性都呈先增加后降低的趋势,当外源 Ca^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时,SOD 活性达到最高(图 3)。但是抗冻性不同的柑橘,其 SOD 活性增加的幅度不同,用 10 mmol/L Ca^{2+} 处理与对照相比,抗冻性最强的宜昌橙其 SOD 活性增加了 15.63%,抗冻性次之的国庆一号增加了 20.45%,抗冻性最弱的朋娜增加了 22.39%(见表 1)。即抗冻性越强,SOD 平均活性越高,其增加率反而越低。

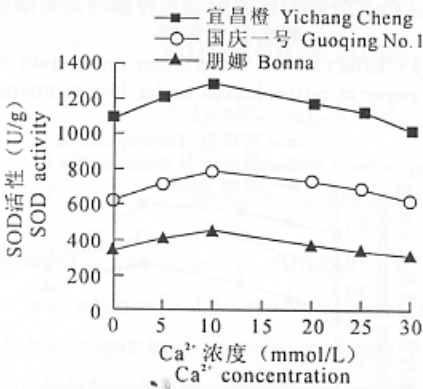


图 3 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片 SOD 活性的影响
Fig 3 Effect of Ca^{2+} on the activity of SOD in citrus leaves under low temperature

表 1 低温胁迫下品种 SOD 活性、POD 活性与增加率间的关系

Table 1 The relation between the activity of SOD and POD with their increasing rate

品种 Cultivar	SOD 平均活性 (U/g)	SOD 增加率(%) The increasing rate of SOD	POD 平均活性 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	POD 增加率(%) The increasing rate of POD
宜昌橙 Yichang Cheng	1148a	15.63	780556a	13.39
国庆一号 Guoqing No. 1	688b	20.45	11802b	26.89
朋娜 Bonna	375c	22.39	10692b	50.36

POD 是植物体内 H_2O_2 等活性氧的清除酶,与 SOD 协同作用,具有清除植物细胞内过多的活性氧和自由基、维持活性氧和自由基代谢平衡、保护植物免受伤害的作用。低温胁迫下,宜昌橙的 POD 活性平均为 $780\,556\,\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 国庆一号的 POD 活

性平均为 $11\,802\,\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 朋娜脐橙的 POD 活性平均为 $10\,692\,\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。宜昌橙的活性远大于国庆一号和朋娜,而国庆一号和朋娜脐橙的 POD 活性差异不显著(见表 1)。

从表 2 可以看出 POD 活性与 SOD 活性变化趋势基本相同,低温胁迫下,一定浓度 Ca^{2+} 处理可增加柑橘叶片 POD 活性,随外源 Ca^{2+} 浓度增加,3 个品种的 POD 活性都呈先增加后降低的趋势,以 10 mmol/L Ca^{2+} 浓度处理效果最好,可使 POD 活性达到最高。但是抗冻性不同的柑橘,其 POD 活性增加的幅度不同,用 10 mmol/L Ca^{2+} 处理与对照相比,抗冻性最强的宜昌橙 POD 活性增加了 13.38%,抗冻性次之的国庆一号增加了 26.89%,抗冻性最弱的朋娜增加了 50.36%(表 2)。

表 2 低温下各种 Ca^{2+} 处理浓度对

柑橘叶片 POD($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)活性的影响

Table 2 Effect of Ca^{2+} treatment on the activity of POD in citrus leaves with low temperature stress

品种 Cultivar	Ca^{2+} 浓度 0	Ca^{2+} 浓度 5	Ca^{2+} 浓度 10	Ca^{2+} 浓度 20	Ca^{2+} 浓度 25	Ca^{2+} 浓度 30
朋娜 Bonna	6907	10560	13913	12533	10800	9440
国庆一号 Guoqing No. 1	10220	12567	13980	12427	11420	10200
宜昌橙 Yichang Cheng	809444	881667	934444	803333	662777	591667

2.3 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片 MDA 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化的最终产物。植物遭受低温危害,细胞生物膜构象发生变化,膜脂上的脂肪酸从无序排列的液晶相变成有序排列的凝胶相,直接影响到膜结合酶的比例和活性,使代谢活动失调,使细胞无法发挥正常的调节能力,这种作用的结果会产生大量有害物质,对细胞产生毒害作用。MDA 的含量与田间柑橘品种的抗冻性有密切关系,宜昌橙的 MDA 平均含量为 $1.333\,\mu\text{mol/g}$, 国庆一号的 MDA 平均含量为 $2.731\,\mu\text{mol/g}$, 朋娜脐橙的 MDA 平均含量为 $4.996\,\mu\text{mol/g}$, 三者之间差异显著。这说明品种抗寒性越强,MDA 含量越低,反之,含量越高。低温胁迫下,不同浓度的外源 Ca^{2+} 处理叶片,品种间 MDA 含量变化趋势相同,随外源 Ca^{2+} 浓度增加,3 个品种的 MDA 含量都呈先降后升的趋势,当外源 Ca^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时,MDA 含量最低(图 4)。但与对照相比,抗冻性不同的柑橘,其 MDA 含量降低的幅度不同,抗冻性最强的宜昌橙 MDA 含量降低了 96.23%,抗冻性次之的国

庆一号降低了 33.37%, 抗冻性最弱的朋娜降低了 19.99%, 这说明柑橘的抗冻性越强, 对外源 Ca^{2+} 越敏感, MDA 含量越低, 叶片受损程度越轻, 所以低温胁迫下适量的 Ca^{2+} 处理可抑制质膜受损, 增强膜的抗冻性。

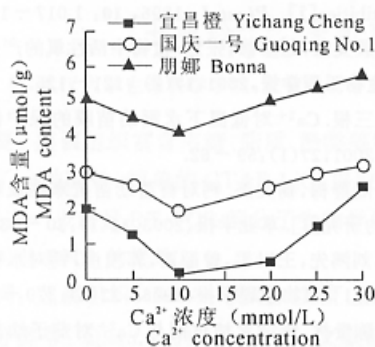


图 4 Ca^{2+} 处理对低温胁迫下柑橘叶片 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effect of Ca^{2+} treatment on content of MDA in citrus leaves under low temperature

3 讨论

糖的积累与细胞渗透浓度的升高有直接关系, 液泡中积累大量糖可增加细胞的保水能力, 以增加组织中的非结冰水, 因此, 可溶性糖的抗寒作用机理是调节组织渗透势^[12]。低温胁迫下, 植物的淀粉水解作用加强, 可溶性糖含量增多。淀粉水解为呼吸提供了基质, 并能增加细胞的渗透势, 在抵抗环境胁迫上具有一定的保护作用。Levitt 证明, 越冬植物无论是草本植物或木本植物, 从秋季到冬季的低温锻炼过程中, 细胞内可溶性糖含量增加, 到翌年春天解除锻炼时降低^[13]。康国章等证实 CaCl_2 能增加香蕉幼苗叶片可溶性糖积累, 减缓叶绿体降解, 提高幼苗的抗冷力^[6]。但也有研究发现, 可溶性糖的积累并不与植物的抗冷力密切相关^[14], 推测可溶性糖的积累可能是植物细胞在冷胁迫下的一种应激反应, Ca^{2+} 加强了这种应激程度。本实验以 0~30 mmol/L 的 Ca^{2+} 进行实验, 发现抗冻性越强, 可溶性糖含量越高, 这与前人研究结果类似, 且可溶性糖的含量随外源 Ca^{2+} 浓度的增加而增加, 但增加率与品种的田间抗冻性成反比。由于 Ca^{2+} 本身就有调节组织渗透势的能力, 推测细胞内较高浓度的 Ca^{2+} 起到了植物通过分解碳水化合物提高可溶性糖含量来调节细胞渗透势的相似作用, 从而降低了植物对有机物的消耗, 有利于植物生长。

SOD 和 POD 是植物对膜脂过氧化的酶促防御系统中重要的保护酶。SOD 在细胞保护酶系统中的

作用是清除超氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 同时产生歧化产物 H_2O_2 , 避免超氧自由基对膜的伤害。POD 在保护酶系统中主要是起到酶促降解 H_2O_2 的作用, 避免细胞膜的过氧化伤害。因为 H_2O_2 的过量积累会导致毒性更大的 $\cdot\text{OH}$ 含量增加, 进而对细胞膜产生伤害。一般情况下, 细胞内的活性氧与防御系统之间保持着平衡^[15,16]。而环境胁迫使植物细胞内活性氧的产生速度加快, SOD、CAT 和 POD 等膜保护酶活性降低, 细胞内积累大量的活性氧, 从而使膜脂过氧化作用加剧, MDA 大量积累, 引发质膜透性的增大, 导致膜的损伤^[17]。大量实验^[18-22]证明, CaCl_2 浸种处理可以提高低温胁迫下幼苗的 SOD、CAT 和 POD 的活性, 减少 MDA 的积累。而且, 幼苗的损伤较轻, 细胞膜的修复较快, 说明 Ca^{2+} 可能通过调节低温下幼苗膜保护酶类的活性, 而防止膜脂过氧化, 维持膜的完整性。本实验结果与前人结果相似, 且外源 Ca^{2+} 浓度不宜过高, 当 Ca^{2+} 浓度过高时, 反而加速膜脂受损, 产生钙中毒。

不少学者研究了 SOD 与植物抗寒性的关系, 不同植物对低温胁迫反应不同。一般认为, 低温使植物细胞 SOD 活性降低。低温可使黄瓜试管苗叶各细胞器如线粒体、叶绿体 SOD 活性降低, 并表现为抗寒性差的品种 SOD 活性下降剧烈, 抗寒性强的品种 SOD 下降缓慢^[23]。田廷亮等则报道低温促进油菜 SOD 活性提高, 而且耐寒性强的品种提高幅度较大, 并提出 SOD 活性提高可作为品种抗寒性的生理指标之一^[24]。本实验结果表明, 低温胁迫下, 柑橘品种的抗冻性与 SOD 和 POD 的活性高度相关, 抗冻性越强, SOD 和 POD 的活性越强; Ca^{2+} 处理能提高冷害柑橘叶片的 SOD 及 POD 活性, 抗冻性越强, 对外源 Ca^{2+} 处理反应越不敏感, 其 SOD 和 POD 的活性增加率越小。

参考文献:

- [1] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. *Annu Rev Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1995, 46: 95 - 122.
- [2] 李新国, 张建霞, 孙中海. 柑桔抗寒育种研究进展 [J]. *中国南方果树*, 2004, 33(3): 19 - 21.
- [3] 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.
- [4] 李美如, 刘鸿先, 王以柔, 曾韶西, 郭俊彦. 钙对水稻幼苗抗冷性的影响 [J]. *植物生理学报*, 1996, 22(4): 379 - 384.
- [5] 王春利, 杨建利. 低温胁迫下喷施 CaCl_2 对油菜抗寒性的影响 [J]. *湖北农业科学*, 2001(5): 29 - 30.
- [6] 康国章, 徐玉英, 陶均, 孙谷畴, 王正询. 过氧化氢和氯化钙

- 对香蕉幼苗抗寒性的影响[J], 亚热带植物科学, 2002, **31** (1): 1-4.
- [7] 蒋丽娟, 李培旺, 李昌珠. PP333 与 CaCl_2 对绿玉树扦插苗抗寒性的影响[J]. 湖南林业科技, 2003, **30**(3): 20-23.
- [8] 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [9] Heath R L, Parker L. Photoperitition in isolated diloroplasts kincitics and stoichimetny of faty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1968, **25**: 189-198.
- [10] 李瑞智, 黄林. SO_2 对作物叶片过氧化物酶的影响[J]. 西南师范大学学报, 1984(3): 380-385.
- [11] Fridovich L. The biology of oxygen radical[J]. *Science*, 1987, **201**: 875-880.
- [12] 汤章成. 逆境条件下植物脯氨酸的积累及其可能的意义[J]. 植物生理学通讯, 1984(1): 15-21.
- [13] Levitt J. Responses of plants to environmental stresses[A]. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses[C]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1980. 24-35.
- [14] Rapacz M, Plazek A, Niemczyk E. Frost de-acclimation of barley (*Hordeum vulgare* L.) and meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds). Relationship between soluble carbohydrate content and resistance to frost and the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* (Sacci) shoem[J]. *Annals of Botany*, 2000, **86**(3): 539-545.
- [15] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, **41**: 187-223.
- [16] Prasas T K. Mechanism of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities[J]. *Plant J*, 1996, **10**: 1 017-1 026.
- [17] 杜秀敏, 殷文波, 赵彦修, 张慧. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. 生物工程学报, 2001, **17**(2): 121-125.
- [18] 梁颖, 王三根. Ca^{2+} 对低温下水稻幼苗膜的保护作用[J]. 作物学报, 2001, **27**(1): 59-62.
- [19] 由继红, 陆静梅, 杨文杰. 钙对苜蓿幼苗抗寒性及相关生理指标影响的研究[J]. 草业学报, 2003, **12**(1): 30-33.
- [20] 李美如, 刘鸿先, 王以柔, 曾韶西, 郭俊彦. 钙对水稻幼苗抗冷性的影响[J]. 植物生理学报, 1996a, **22**(4): 379-384.
- [21] 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.
- [22] 张燕, 方力, 李天飞. 钙对低温胁迫下烟草幼苗某些酶活性的影响[J]. 植物学通报, 2002, **19**(3): 342-347.
- [23] 刘鸿先, 曾韶西, 王以柔, 李平, 陈德峰, 郭俊彦. 低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶各细胞器中超氧化物歧化酶(SOD)的影响[J]. 植物生理学报, 1985, **11**(1): 48-57.
- [24] 田廷亮, 季明芳. 油菜 SOD 活性及同工酶的研究[J]. 中国油料, 1988(1): 31-35.