

Ca²⁺ 信号系统对低温下柑橘膜脂 过氧化和抗氧化酶的影响

李新国, 张建霞, 孙中海*

(华中农业大学 国家柑橘育种中心 教育部园艺植物生物学重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 研究不同 Ca²⁺ 处理对低温下柑橘愈伤组织膜脂过氧化和抗氧化酶的变化。结果表明, 一定低浓度的 Ca²⁺ (5 mmol/L) 能明显减少柑橘愈伤组织膜伤害率和膜脂过氧化产物 MDA 的积累, 增加渗透调节物质可溶性蛋白质的含量, 提高膜保护性酶 SOD 和 POD 的活性, 从而增强柑橘的抗寒性。采用 Ca²⁺ 螯合剂乙二醇双乙胺醚-N, N'-四乙酸 (ethylene glycol-bis-β-aminoethylether-N, N'-tetraacetic acid, EGTA) 或钙调素 (calmodulin, CaM) 拮抗剂三氟拉嗪 (trifluoperazine, TFP) 处理会增加膜伤害率和 MDA 的积累, 减少可溶性蛋白质的合成, 降低 SOD 和 POD 的活性。说明钙信号系统参与调节柑橘抗寒中膜脂过氧化和保护性酶等生理生化反应。

关键词: Ca²⁺; EGTA; TFP; 柑橘愈伤组织; 抗氧化酶; 膜脂过氧化

中图分类号: S603.4, Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)04-0643-06

Effects of calcium signal system on anti-oxidant enzymes and membrane lipid peroxidation of citrus under low temperature

LI Xin-Guo, ZHANG Jian-Xia, SUN Zhong-Hai*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, National Center of Citrus Breeding,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Effects of calcium signal system on anti-oxidant enzymes and membrane lipid peroxidation of citrus callus under low temperature were studied. The results showed that exogenous Ca²⁺ (5 mmol/L) could markedly decrease membrane injury rate and malondialdehyde (MDA) accumulation during low temperature stress. Moreover, it could raise the content of soluble protein and increase the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD). Exogenous calcium could strengthen the cold-resistant of citrus, compared with Ca-deficient treatment. But such effects were inhibited by addition of Ca²⁺ chelating agent EGTA or calmodulin antagonist TFP in the culture medium. Taken together the results above, it is suggested that calcium signal system may be involved in the membrane lipid peroxidation and protective enzyme system of cold-resistant of citrus under low temperature.

Key words: Ca²⁺; EGTA; TFP; citrus callus; anti-oxidant enzymes; membrane lipid peroxidation

柑橘是我国南方重要果树, 属典型的亚热带植物。经常出现的低温严重影响柑橘的生长发育, 限制果实品质和产量。同时由于柑橘是多年生的木本

植物, 当年的冻害甚至还会对翌年或以后多年的生产情况产生巨大的危害(何天富, 1999)。研究柑橘在低温条件下的生理生化适应及调控机理, 提高柑

收稿日期: 2005-08-22 修回日期: 2006-04-06

基金项目: 国家自然科学基金(30070528, 30571289)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070528, 30571289)]

作者简介: 李新国(1977-), 男, 湖南邵阳人, 博士研究生, 主要从事植物抗逆生理研究。

* 通讯作者(Author for correspondence)

橘的抗寒性,对于发展柑橘产业具有较大的意义。

Ca^{2+} 作为植物细胞唯一被证实的偶联胞外信号与胞内生理生化反应的胞内第二信使,在植物对环境的反应和适应中起着重要作用。在外界环境信号(如触动、低温、红光、植物激素、病害、水分胁迫等)刺激下,细胞内 Ca^{2+} 浓度瞬时升高,结合并激活 Ca^{2+} 的一个重要受体钙调素(Calmodulin, CaM),形成钙信号系统(Ca-CaM 系统),然后改变蛋白激酶或蛋白磷酸化酶活性,调节相关基因表达,推动相应的生理生化变化(龚明等,1990; Yang 等,2003; Medvedev,2005)。

调节植物抗寒性的一个重要生理生化机制就是细胞氧化应激机制。植物细胞氧化应激机制与植物胞内第二信使有密切的联系(李美如等,1996a)。前人研究证明钙信号系统参与柑橘抗寒性调节(李卫等,1997)。但仍然不清楚钙信号系统是否通过抗氧化机制来影响柑橘抗寒性。本实验选用愈伤组织为试材,是因为愈伤组织与田间材料相比,具有均匀一致,无叶片角质层等一系列保护组织,直接与外界相互作用,对各种刺激较敏感的特点(Recio 等,2003)。本文研究不同钙处理对低温下柑橘愈伤组织膜脂过氧化和抗氧化酶影响,进而探讨钙信号系统对柑橘抗寒调节初步机理,旨在为柑橘等多年生木本经济作物抗寒栽培和抗寒育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料来自国家柑橘育种中心长期继代的抗寒性弱的来檬(*Citrus aurantiifolia*)和抗寒强的国庆1号温州蜜柑(*C. reticulata* cv. Guoqing No. 1)两个柑橘品种愈伤组织,培养于 MT 液体培养基上,110 rpm, 26 ± 1 °C,每日光照时间 16 h,光照强度 $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。每两周左右继代一次。取继代 7 d 后的均匀一致、细胞质浓的愈伤组织接种不同的处理。

1.2 处理

(1)不同浓度 Ca^{2+} 处理:设置 0(记做 MT-Ca), 5, 10, 15 mmol/L 不同浓度 Ca^{2+} 的 MT 培养基, MT 基本培养基 Ca^{2+} 的浓度约为 3 mmol/L。(2) Ca^{2+} 信使抑制剂处理:在 MT-Ca 培养基上增加 0.20 mmol/L EGTA(记做 MT-Ca + EGTA)和 MT 基本培养基上增加 0.20 mmol/L TFP(记做

MT+TFP)两种处理。将以上不同 Ca^{2+} 处理的材料分别置于 3 °C 冰箱进行低温处理 12 d,然后进行生理生化测定。

1.3 膜伤害率的测定

用蒸馏水和重蒸水先后清洗 2~3 次柑橘愈伤组织,吸干水分,称取 0.20 g 材料。参考李卫等(1998)的方法,用 DDS-11A 型电导仪测定膜伤害率(membrane injure rate, MIR)。

1.4 生理生化指标的测定

取出低温处理之后的柑橘愈伤组织,吸干培养基,称取 0.50 g 材料。用 5 mL 0.5 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液(含 1%聚乙烯吡咯烷酮 PVP)于冰浴研磨后, 4 °C $10\,000 \times g$ 离心 20 min,上清液备用。超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定,采用氮蓝四唑(NBT)法测定(李合生,2000a),以抑制 NBT 光化还原 50%所需的酶量为一个酶活性单位。过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法测定(陈建勋等,2002),以在 470 nm 下每分钟变化 0.01 所需的酶量为一个酶活性单位。丙二醛(MDA)的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定(张宪政,1992),分别测定 532 nm 和 600 nm 波长处的吸光度值,以 nmol/g 表示 MDA 含量。可溶性蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 法测定(李合生,2000b),以牛血清白蛋白(BSA)作标准曲线。

以上指标测定重复三次。数据均数间进行显著性检验和 LSD 多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Ca^{2+} 处理对低温下柑橘愈伤组织膜伤害率和 MDA 含量的影响

质膜是植物低温伤害的最初和最敏感的部位。低温胁迫时质膜结构遭到破坏,内部溶质渗漏,透性增加,电导度增加。细胞的膜伤害率增加可以反映低温胁迫对植物受寒害的情况加重(简令成,1983)。从图 1 可以看出,在同一浓度 Ca^{2+} 处理下,抗寒性弱的来檬愈伤组织比抗寒性强的国庆 1 号膜伤害率大。对于同一品种而言,不同的 Ca^{2+} 浓度处理对膜伤害率影响差别很大。3、5 和 10 mmol/L Ca^{2+} 处理来檬,它的膜伤害率分别比对照(0 mmol/L, Ca^{2+})处理显著或极显著地减少了 12.0%、18.3% 和 8.6%。但用 15 mmol/L Ca^{2+} 浓度处理时膜伤害率与对照相差不大。国庆 1 号也表现相同的规

律,3、5、10 和 15 mmol/L Ca^{2+} 处理,国庆 1 号的膜伤害率分别比对照 Ca^{2+} 处理减少了 25.2%、29.1%、12.2% 和 2.9%。但 Ca^{2+} 浓度为 15 mmol/L 时膜伤害率与对照之间差异不显著。说明低浓度的 Ca^{2+} 处理可明显地减少低温下柑橘的膜伤害率。

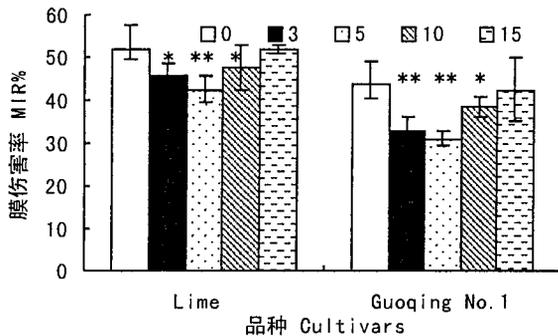


图 1 低温下不同 Ca^{2+} 浓度对柑橘愈伤组织膜伤害率的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of Ca^{2+} on membrane injury rate in citrus calli under low temperature
直方图上标注 * 和 ** 表示该处理与对照(0 mmol/L Ca^{2+})之间在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 差异显著性。下同。

* and ** on the histogram mean the significant difference between the treated group and the control group(0 mmol/L Ca^{2+}) at $P < 0.05$ and at $P < 0.01$. The same below.

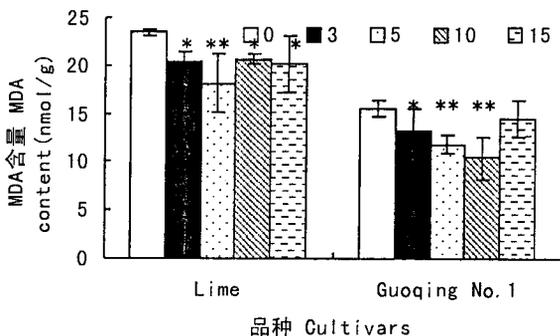


图 2 不同 Ca^{2+} 浓度对低温下柑橘愈伤组织 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Ca^{2+} on MDA content of citrus calli under low temperature

MDA 是植物逆境时膜脂过氧化作用的最终分解产物,能与蛋白质氨基酸残基或核酸反应生成 Schiff 碱,降低膜的稳定性,促进膜的渗漏,其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度(陈少裕, 1991)。图 2 表明,来檬和国庆 1 号的 MDA 含量与膜伤害率分别表现相同的趋势。来檬抗寒性差,膜脂过氧化产物 MDA 积累较国庆 1 号多。用 3、5、10 和 15 mmol/L Ca^{2+} 处理时来檬的 MDA 分别比对照处理

显著或极显著地减少 12.7%、22.6%、11.8% 和 14.2%。而国庆 1 号用 3、5、10 和 15 mmol/L Ca^{2+} 处理时 MDA 分别比对照处理减少 14.5%、24.0%、35.3% 和 6.7%,但 15 mmol/L Ca^{2+} 处理和对照之间差异没有达到显著水平。这说明低浓度的 Ca^{2+} 处理能有效保持低温下柑橘质膜的稳定性和完整性,减少膜脂过氧化程度,有利于提高抗寒性。

2.2 不同浓度 Ca^{2+} 对低温下柑橘愈伤组织可溶性蛋白质含量影响

植物细胞内可溶性蛋白质含量影响细胞内渗透势大小的重要渗透调节物质之一。图 3 表明,国庆 1 号的可溶性蛋白质含量高于来檬。随着 Ca^{2+} 浓度的升高,可溶性蛋白质含量变化先上升后下降。对照处理时柑橘愈伤组织可溶性蛋白质含量最低,用 3、5、10 和 15 mmol/L Ca^{2+} 处理时来檬的可溶性蛋白质含量分别比对照处理显著或极显著地增加 17.2%、26.8%、36.4% 和 30.3%。而国庆 1 号用 3、5 和 10 mmol/L Ca^{2+} 处理时,可溶性蛋白质含量分别比对照处理显著或极显著地增加 9.6%、17.3% 和 10.3%,但用 15 mmol/L Ca^{2+} 只比对照增加了 2.8%,两者之间差异不显著。这说明了低浓度 Ca^{2+} 促进了柑橘蛋白质合成,增加了可溶性蛋白质的含量。

2.3 不同浓度 Ca^{2+} 对低温下柑橘愈伤组织 SOD 和 POD 活性影响

SOD 和 POD 是植物体内重要的酶促防御系统的两种保护酶,其活性与抗逆性密切相关。国庆 1 号的 SOD 或 POD 活性都分别高于来檬,尤其是 POD 活性变化非常敏感,两者之间相差非常大。但对于同一品种而言,随着 Ca^{2+} 浓度升高。柑橘的 SOD 或 POD 活性呈现先升后降的趋势。来檬在 10 mmol/L 处理时 SOD 和 POD 活性最高,分别比对照增加了 51.1% 和 51.8%。而国庆 1 号在 5 mmol/L 处理时 SOD 和 POD 活性最高,分别比对照增加了 20.3% 和 13.4%。这说明低浓度的 Ca^{2+} 能诱导柑橘抗氧化酶 SOD、POD 活性的增加,以抵抗逆境下诱导的氧化胁迫。

2.4 Ca^{2+} 专一整合剂 EGTA 和 CaM 拮抗剂 TFP 对低温下柑橘愈伤组织膜伤害率、MDA 含量、可溶性蛋白质含量、SOD 和 POD 活性的影响

EGTA 能整合细胞壁的 Ca^{2+} ,阻止胞外 Ca^{2+} 进入细胞质,减少细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,影响 Ca^{2+}

信号系统传导途径的基础。图 6,7,8,9,10 表明, MT-Ca+ EGTA 处理比 MT-Ca 处理,来檬的膜伤害率和 MDA 含量分别增加了 4.8%和 21.4%($P < 0.01$),国庆 1 号分别增加了 4.3%和 4.8%($P < 0.05$)。另一方面,来檬可溶性蛋白质含量、SOD 和 POD 活性分别减少 9.0%($P < 0.05$)、13.5%($P < 0.05$)和 9.0%($P < 0.05$),国庆 1 号分别减少了 14.1%($P < 0.05$)、12.8%($P < 0.05$)和 13.7%($P < 0.05$)。

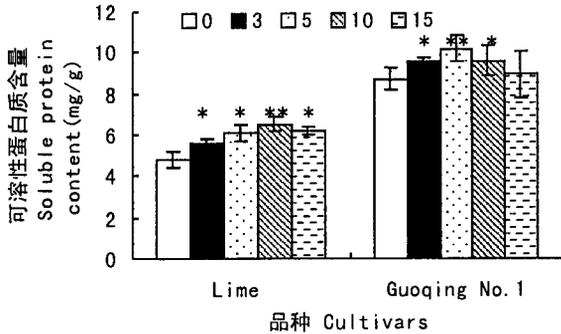


图 3 低温下不同 Ca^{2+} 浓度对柑橘愈伤组织可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of Ca^{2+} on soluble protein content of citrus calli under low temperature

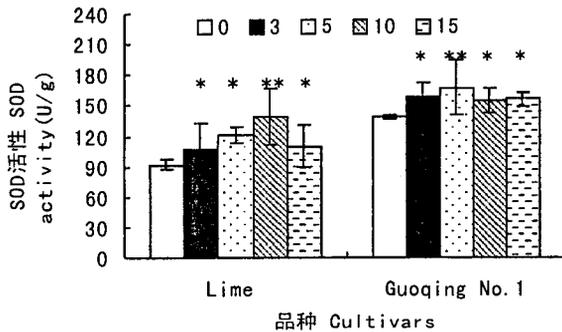


图 4 低温下不同 Ca^{2+} 浓度对柑橘愈伤组织 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of Ca^{2+} on SOD activity of citrus calli under low temperature

TFP 是 CaM 拮抗剂,影响 Ca^{2+} 与 CaM 的结合,干扰了 Ca-CaM 系统。从图 6,7,8,9,10 可知, MT+TFP 处理比 MT 处理来檬的膜伤害率和 MDA 含量分别增加 6.6%($P < 0.05$)和 20.0%($P < 0.01$),国庆 1 号分别增加 7.7%($P < 0.05$)和 18.9%($P < 0.01$)。另一方面,来檬可溶性蛋白质含量、SOD 和 POD 活性分别减少 27.1% ($P <$

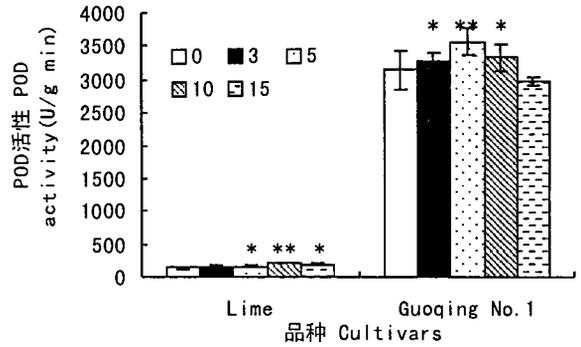


图 5 低温下不同 Ca^{2+} 浓度对柑橘愈伤组织 POD 活性的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of Ca^{2+} on POD activity of citrus calli under low temperature

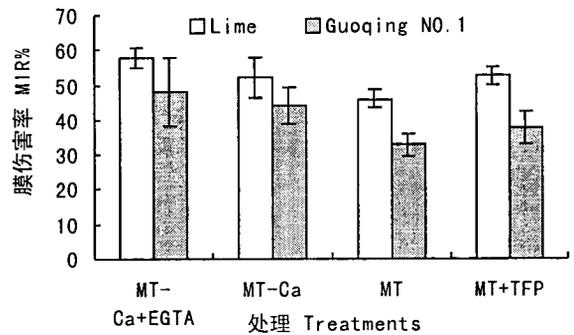


图 6 EGTA 和 TFP 处理对低温下柑橘愈伤组织膜伤害率的影响

Fig. 6 Effects of EGTA or TFP treatment on membrane injury rate in citrus calli under low temperature

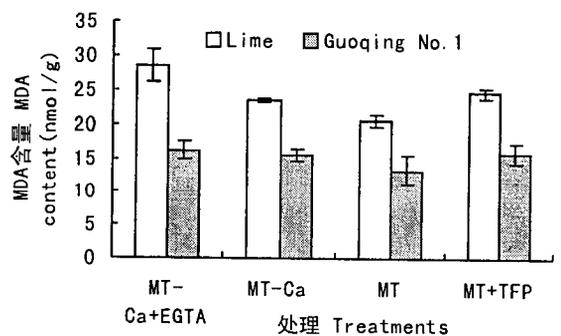


图 7 EGTA 和 TFP 处理对低温下柑橘愈伤组织 MDA 含量的影响

Fig. 7 Effects of EGTA or TFP treatment on MDA content of citrus calli under low temperature

0.01)、39.3%($P < 0.01$)和 18.1%($P < 0.01$),国庆 1 号分别减少 25.1%($P < 0.01$)、53.0%($P < 0.01$)和 13.7%($P < 0.05$)。这说明培养基中加入 EGTA

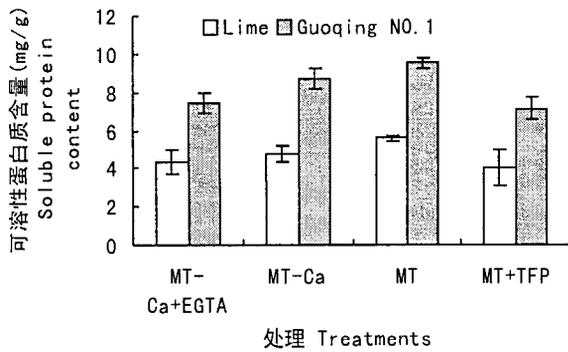


图 8 EGTA 和 TFP 处理对低温下柑橘愈伤组织可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 8 Effects of EGTA or TFP treatment on soluble protein content of citrus calli under low temperature

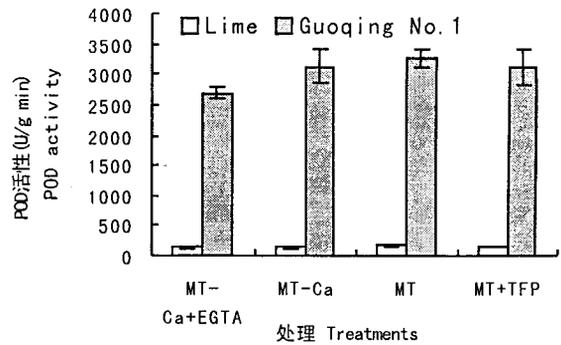


图 10 EGTA 和 TFP 处理对低温下柑橘愈伤组织 POD 活性的影响

Fig. 10 Effects of EGTA or TFP treatment on POD activity of citrus calli under low temperature

和 TFP 处理,阻碍了 Ca-CaM 系统信号的发生,引起诸如质膜的破坏程度加剧,膜脂过氧化导致 MDA 的积累增加,蛋白质合成受阻,保护性酶 SOD 和 POD 活性降低等生理生化反应,从而柑橘的抗寒力降低。

3 讨论

植物在低温胁迫下,产生大量的自由基(O_2^- 、OH 和 HO_2^- 等)和活性氧($^1\text{O}_2$ 、 H_2O_2 和 LOOH 等),引起膜脂过氧化和蛋白质破坏。正常情况下,

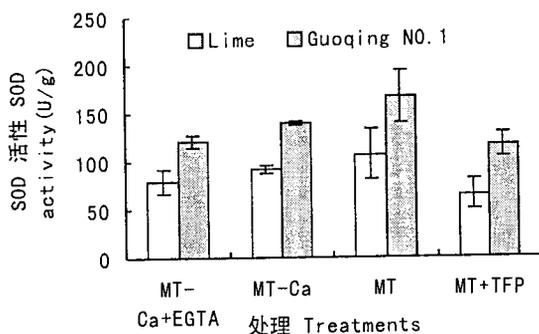


图 9 EGTA 和 TFP 处理对低温下柑橘愈伤组织 SOD 活性的影响

Fig. 9 Effects of EGTA or TFP treatment on SOD activity of citrus calli under low temperature

植物细胞具有一定的抗氧化能力,能够产生清除细胞的自由基和活性氧的物质。这些物质包括酶类(CAT、SOD 和 POX 等)和非酶促(GSH、AsA、CAR 和 VitE 等)两类。自由基、活性氧和清除它们的酶类、非酶类区域化地分布在细胞内,其生成与清

除处于动态平衡(李美如等,1996a)。由于抗氧化系统是植物主要的防御系统,现已经成功培育了抗低温的转抗氧化酶植株(Allen,1995)。 Ca^{2+} 是植物中重要的第二信使,在植物抗寒反应中对冷信号的接受与传递过程起着重要作用。植物冻害胁迫后,短时间内胞内游离 Ca^{2+} 浓度的增加,激活某些有关的蛋白激酶,使有些相应的蛋白质磷酸化,诱发抗冻基因表达,启动胞内的各种生理生化适应机制来增强植物的抗寒能力(Nisi 等,1996;简令成等,2002)。利用外源 Ca^{2+} 处理通过抗氧化作用来增强植物的抗寒性常有报道,尤其在一年生作物上报道较多。在烟草(张燕等,2002)和黄瓜(王丽萍等,2004)上,利用外源 Ca^{2+} 处理幼苗后的 SOD、CAT 和 POD 等保护酶活性下降程度较未经处理的轻,电解质渗透率低。在水稻上,外源 Ca^{2+} 处理能提高幼苗叶片中内源氧化剂(GSH, AsA)含量和膜保护酶(CAT, SOD 和 POD)活性,也增加可溶性蛋白质中煮沸稳定蛋白质的含量(李美如等,1996b),同时降低电解质渗漏率和 MDA 含量,保护叶绿体和线粒体超微结构免遭破坏。但缺 Ca^{2+} 的水稻幼苗在低温胁迫下,细胞膜功能及超微结构破坏严重(梁颖等,2001)。本试验以多年生柑橘为试材,表明了 5 mmol/L Ca^{2+} 能有效地维持柑橘愈伤组织细胞膜的稳定性,减少 MDA 的积累,增加了可溶性蛋白质含量、SOD 和 POD 活性,提高了柑橘的抗寒性。

低温胁迫过程中,胞内 Ca^{2+} 浓度会升高,激活 CaM,使 CaM 含量的增加(李卫等,1997;Lin 等,2002),引发后续的一系列生理生化反应。如果用 Ca^{2+} 通道阻断剂 La^{3+} 、 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 或 BAPTA、CaM 拮抗剂 TFP、CPZ 或 W7 等效剂处理

后,阻断了Ca-CaM信使系统,从而抑制植物抗寒力提高(Monroy, 1993; 简令成等, 2002; 高洪波等, 2002; Krol等, 2003)。而这些阻断剂本身不会对细胞产生毒害作用,即不会对细胞正常的代谢活动造成负面影响(陈曦等, 2002)。对冷处理水稻幼苗在处理前用EGTA和CPZ进行预处理,观察到明显地抑制有冷诱导的提高抗寒力的作用(曾韶西等, 1999)。在烟草幼苗中,采用CPZ处理能部分抑制Ca²⁺提高SOD、CAT和POD活性的作用(张燕等, 2002),部分抑制Ca²⁺降低冷害植物的电解质渗透率及MDA含量(梁颖等, 2001)。本研究用Ca²⁺螯合剂EGTA和CaM拮抗剂TFP阻断了Ca²⁺信号系统,相应地会增加柑橘的膜伤害率和MDA含量,减少了可溶性蛋白质的合成,降低了SOD和POD活性。表明钙信号系统参与柑橘抗寒中膜脂过氧化和保护性酶的调节作用,为从抗逆信号角度阐述多年生柑橘抗寒机理提供了初步依据。

参考文献:

- 李合生. 2000a. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 167-169
- 李合生. 2000b. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 184-185
- 李美如, 刘鸿先, 王以柔. 1996a. 细胞氧化应激机制与植物抗冷性机理的研究[J]. 生命科学, 8(4): 30-34
- 何天富. 1999. 柑橘学[M]. 北京:中国农业出版社, 525-547
- 张宪政. 1992. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社, 215-216
- 陈建勋, 王晓峰. 2002. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社, 120-121
- 简令成. 1983. 生物膜与植物寒害和抗寒性的关系[J]. 植物学通报, 1: 17-23
- 简令成, 王红. 2002. 钙(Ca²⁺)在植物抗寒中的作用[J]. 细胞生物学杂志, 24(3): 166-171
- Allen RD. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants[J]. *Plant Physiol*, 107: 1 049-1 054
- Chen SY(陈少裕). 1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell(膜脂过氧化对植物细胞的伤害)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 27(2): 84-89
- Chen X(陈曦), Dai HQ(代焕琴), Zhang XJ(张旭家), et al. 2002. The effects of cold acclimation and Ca²⁺ signal on the synthesis of antifreeze proteins and the freezing tolerance of cells in carrot(*Daucus carota*)(低温胁迫及Ca²⁺信号对胡萝卜悬浮培养细胞抗冻蛋白的合成及细胞抗冻能力的影响)[J]. *Sci Tech Eng*(科学技术与工程), 2(3): 23-26
- De Nisi P, Zocchi G. 1996. The role of calcium in the cold shock responses[J]. *Plant Sci*, 121: 161-166
- Gao HB(高洪波), Chen GL(陈贵林). 2002. The effect of calmodulin antagonist and calcium on chilling resistance of eggplant seedling(钙调素拮抗剂与Ca²⁺对茄子幼苗抗冷性的影响)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 29(3): 243-246
- Gong M(龚明), Li Y(李英), Tsao TH(曹宗巽). 1990. Calcium message system in plants(植物体内的钙信使)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 7(3): 19-29
- Krol E, Dziubinska H, Trebacz K. 2003. Low-temperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*[J]. *Plant Cell Physiol*, 44(5): 527-533
- Liang Y(梁颖), Wang SG(王三根). 2001. The protective function of Ca²⁺ on the membrane of rice seedling under low temperature stress(Ca²⁺对低温下水稻幼苗膜的保护作用)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), 27(1): 59-64
- Li MR(李美如), Liu HX(刘鸿先), Wang YR(王以柔), et al. 1996b. Effect of calcium the cold-resistance of rice seedling(钙对水稻幼苗抗冷性的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 22(4): 379-384
- Li W(李卫), Sun ZH(孙中海), Zhang WC(章文才), et al. 1997. Role of Ca²⁺ and calmodulin on freezing tolerance of *Citrus* protoplasts(钙与钙调素对柑橘原生质体抗冻性的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 23(3): 262-266
- Li W(李卫), Sun ZH(孙中海), Zhang WC(章文才), et al. 1998. Establishment of an index to appraise cold-resistant breeding for *Citrus* in early stage(柑橘抗寒育种早期鉴定的一种指标)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 40(9): 827-830
- Lin SZ, Zhang ZY. 2002. Effects of cold acclimation and CaCl₂ on total soluble protein, CaM and freezing resistance of *Populus tomentosa* seedlings[J]. *Forest Stud China*, 4(1): 5-12
- Monroy AF, Casotnganay Y, Laberge S, et al. 1993. A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at suberzone temperature[J]. *Plant Physiol*, 107: 141-148
- Medvedev SS. 2005. Calcium signaling system in plants[J]. *Russian J Plant Physiol*, 52(2): 249-270
- Recio E, Encina A, Alvarez JM, et al. 2003. Autolysis-like release of homogalacturonan from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cell walls[J]. *Plant Sci*, 164: 579-588
- Wang LP(王丽萍), Ren LY(任良玉), Wang R(王冉), et al. 2004. Effects of calcium on growth and antioxidant systems of cucumber seedlings(钙对黄瓜幼苗生长及抗氧化系统的影响)[J]. *J Agri Univ Hebei*(河北农业大学学报), 27(1): 34-37
- Yang T, Poovalah BW. 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants[J]. *Trends in Plant Sci*, 8(10): 505-512
- Zeng SX(曾韶西), Li MR(李美茹). 1999. Changes of Ca²⁺-ATPase activities in cell of rice seedling during the enhancement of chilling resistance induced by cold and salt pretreatment(冷和盐预处理提高水稻幼苗抗寒性期间细胞Ca²⁺-ATP酶活性的变化)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(2): 156-160
- Zhang Y(张燕), Fang L(方力), Li TF(李天飞), et al. 2002. Effect of Ca²⁺ on activities of some enzymes in tobacco seedlings under cold stress(钙对低温胁迫的烟草幼苗某些酶活性的影响)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 19(3): 342-34