

## Ca<sup>2+</sup>参与NO对切花月季瓶插期间 乙烯合成的调控

张少颖<sup>1,2</sup>, 饶景萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; <sup>2</sup>山西师范大学食品工程系, 山西临汾 041004)

**摘要:**为研究Ca<sup>2+</sup>在NO对切花月季瓶插期间乙烯合成调控中的作用,分别用0.1 mmol/L SNP(NO供体)、0.1 mmol/L SNP+0.3 mmol/L的TFP(CaM)、0.1 mmol/L SNP+10 mmol/L的TFP(Ca<sup>2+</sup>螯合剂)、6 mmol/L Ca<sup>2+</sup>、6 mmol/L Ca<sup>2+</sup>+0.05 mmol/L的PTIO(NO清除剂)处理切花月季‘Kardinal’,研究切花瓶插期间内源乙烯的生物合成变化。结果表明,Ca<sup>2+</sup>处理能提高月季瓶插前期花瓣中的NOS活性,保持了花瓣中的NO的较高水平,减缓切花瓶插后期NOS活性的升高,进一步研究表明,Ca<sup>2+</sup>螯合剂EGTA和CaM的抑制剂TFP处理却可使花瓣中的ACS和ACO活性升高,ACC的含量增加,从而加速了乙烯的生物合成;同时,NO的清除剂PTIO处理也可以抑制由于Ca<sup>2+</sup>处理导致的ACS和ACO的活性降低以及乙烯合成底物ACC的含量下降。Ca<sup>2+</sup>和CaM可能参与了NO对切花瓶插期间乙烯的合成调控及其信号转导。

**关键词:**月季;Ca<sup>2+</sup>;NO;乙烯生物合成

**中图分类号:**S685.12 **文献标识码:**A

### Involvement of Ca<sup>2+</sup> in Ethylene Biosynthesis of Cut Rose during Vasing Regulated by Nitric Oxide

Zhang Shaoying<sup>1,2</sup>, Rao Jingping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Northwest Sic-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shanxi 712100;

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Shanxi Normal University, Linfen Shanxi 041004)

**Abstract:** The effect of Ca<sup>2+</sup> in ethylene biosynthesis of cut rose during vasing regulated by nitric oxide (NO) was studied. Cut rose ‘Kardinal’ were treated with 0.1 mmol/L SNP (nitric oxide doner), 0.1 mmol/L SNP plus 0.3 mmol/L的TFP (CaM inhibitor), 0.1 mmol/L SNP plus 10 mmol/L的TFP (calcium chelator), 6 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 6 mmol/L Ca<sup>2+</sup> plus 0.05 mmol/L PTIO (nitric oxide scavenger ) for 3 h. The results showed: exogenous Ca<sup>2+</sup> treatment improved NOS activity during the former vasing, maintained relative higher NO content in petals, postponed the increase of NOS activity during the latter vasing. Further study showed that EGTA and TFP treatment stimulated ACS and ACO activity, accelerated the increase of ACC content, advanced the ethylene biosynthesis in petals during vase; at the same times, PTIO also inhibited the decrease of ACS, ACO activities and ACC content which induced by Ca<sup>2+</sup> treatment. It also proved that Ca<sup>2+</sup> and CaM participated in regulation of endogenous ethylene biosynthesis and signal transduction during cut rose vasing.

**Key words:** rose, Ca<sup>2+</sup>, nitric oxide, ethylene biosynthesis

#### 0 引言

Ca<sup>2+</sup>在调控植物成熟和衰老方面的研究很多,它不但可以作为细胞的组分维护细胞壁和细胞膜的结构和功能,又作为第二信使感受外界的刺激,调控植物的

成熟和衰老<sup>[1-2]</sup>。研究表明,NO可通过调控乙烯生物合成中的关键酶——ACS(ACC合成酶)和ACO(ACC氧化酶)的活性调节内源乙烯合成<sup>[3-4]</sup>,但在此过程中是否有Ca<sup>2+</sup>参与还未见报道。植物体可以通过一氧化氮

**基金项目:**山西师范大学博士科研启动费(833089)。

**第一作者简介:**张少颖,女,1977年出生,陕西户县人,博士,研究方向:农产品的贮藏与保鲜。通信地址:041004 山西省临汾市贡院街1号,山西师范大学工程学院食科系。Tel: 0537-2092489, E-mail: zsynew@163.com。

**收稿日期:**2009-04-09, **修回日期:**2009-05-06。

合酶(NOS)途径合成NO。Ca<sup>2+</sup>/CaM可激活NOS导致NO的形成<sup>[5]</sup>。此外,NO的信号转导的三条主要途径中的两条:(a)cGMP依赖型途径,通过调节cADPR而引起胞浆Ca<sup>2+</sup>浓度变化,从而调控各种生理反应;(b)cGMP非依赖型途径,NO通过蛋白质硝酰化作用直接作用于钙离子通道,都是通过作用于Ca<sup>2+</sup>而实现的。切花月季‘Kardinal’是一种类似乙烯跃变型的切花,NO处理可以调控乙烯的生物合成,调节切花的开花和衰老,延长切花的寿命。笔者以切花月季‘Kardinal’为试材,研究了NO调控的月季切花的衰老与外源Ca<sup>2+</sup>的关系,以及Ca<sup>2+</sup>在NO调控的切花衰老过程中的作用,为深入了解NO的生理作用和作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料切花月季(*Rose hybrida*)品种‘Kardinal’花材来自西北农林科技大学花卉基地。按照商业采收标准,即开花级数2级时采收。试验于2007年5—7月在西北农林科技大学园艺学院园艺产品的贮藏保鲜实验室完成。NO供体硝普钠(SNP)、和NO清除剂2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-羟-3-氧(PTIO)、CaM抑制剂三氟啦嗪(TFP)由Sigma公司生产;Ca<sup>2+</sup>螯合剂乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA),购自美国Amresco公司,进口分装;CaCl<sub>2</sub>由西安试剂公司生产。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设计 月季采切后进行以下处理:S处理:0.1 mmol/L SNP溶液瓶插3 h;S+T和S+E处理:S处理后再分别于0.3 mmol/L的TFP和10 mmol/L的EGTA中瓶插3 h;C处理:6 mmol/L CaCl<sub>2</sub>溶液瓶插3 h;C+P

处理:C处理后,再于0.05 mmol/L的PTIO溶液中瓶插3 h;CK(对照):在蒸馏水中瓶插3 h。处理后再于蒸馏水中瓶插观察,定期取样。设3次重复,每次重复30枝花。

1.2.2 呼吸速率和乙烯释放速率的测定 呼吸速率采用HEL-7001型红外二氧化碳测定仪测定;乙烯释放速率用美国热电GL-94PTF气相色谱仪测定,FID检测器,柱温70℃,检测室温度150℃,外标法测定。

1.2.3 NOS活性和NO含量的测定 NO含量和NOS活性参考苏梦云等<sup>[6]</sup>的方法测定。

1.2.4 LOX、ACS、ACO活性和ACC含量的测定 LOX活性参考陈昆松等<sup>[7]</sup>的方法测定;ACS活性根据Woester等<sup>[8]</sup>的方法测定;ACO活性和ACC含量参考李富军等<sup>[9]</sup>的方法。

### 1.3 数据分析

数据统计分析采用DPS数据处理系统进行Duncan’s多重比较检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 Ca<sup>2+</sup>处理对月季切花花瓣中的NOS活性及NO含量的影响

如图1所示,在月季切花瓶插期间,NOS活性和NO含量的变化趋势均表现为先下降再上升的趋势。与对照相比,C处理NOS活性的最小值出现时间推后1天,且其最小值显著高于对照(高42.35%);NO含量的最小值比对照退后1天,且其最小值比对照高36.08%。因此,C处理不但可以抑制月季瓶插前期花瓣中的NO含量的降低,同时,还可以延缓瓶插后期NO含量的升高,可以推测,C处理可能通过调节NOS活性来调控NO含量的高低,从而实现对切花组织衰老的调控。

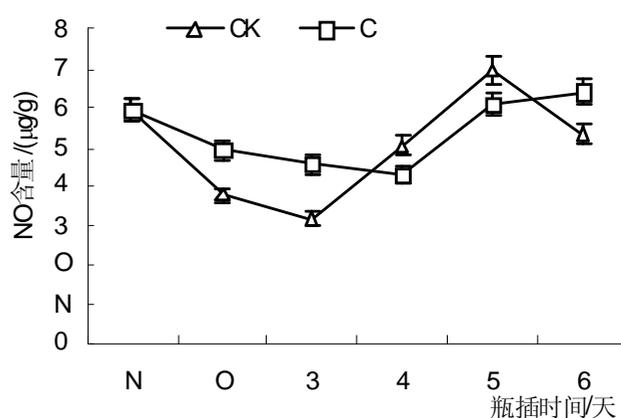
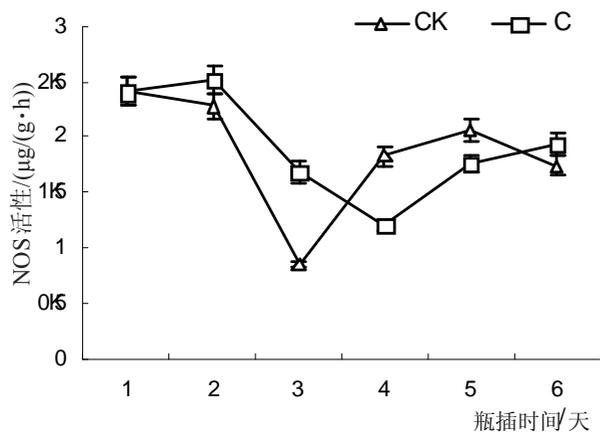


图1 Ca<sup>2+</sup>处理对月季花瓣中NOS活性和NO含量的影响

### 2.2 Ca<sup>2+</sup>处理对月季切花呼吸速率和乙烯释放速率的影响

图2表明,切花月季‘Kardinal’有明显的呼吸跃变

峰和乙烯释放高峰。与对照相比,C处理的呼吸峰推后1天出现,但二者的峰值的大小差异不显著( $P > 0.05$ )。因此,C处理可以延缓月季切花呼吸跃变高峰

的到来,而不能降低其峰值。‘Kardinal’切花的乙烯释放高峰分别于瓶插第3天和第4天出现,比呼吸高峰提前1天。C处理的乙烯释放量上升速度较对照慢,瓶

插第4天出现高峰,比对照推后1天,且其峰值比对照低22.60%。因此,C处理抑制了月季切花的乙烯释放速率,延缓了乙烯释放高峰的到来。

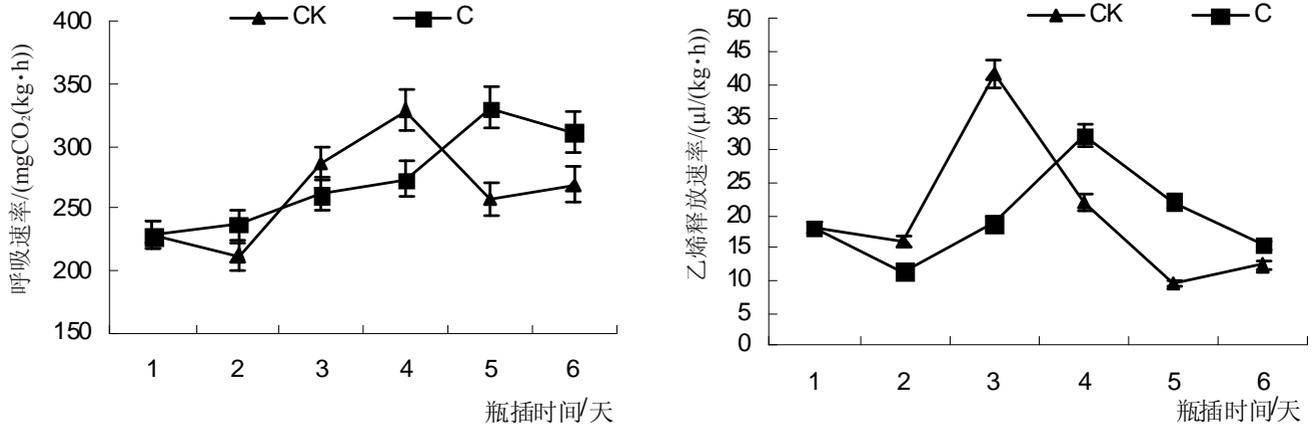


图2 Ca<sup>2+</sup>处理对月季切花呼吸速率和乙烯释放速率的影响

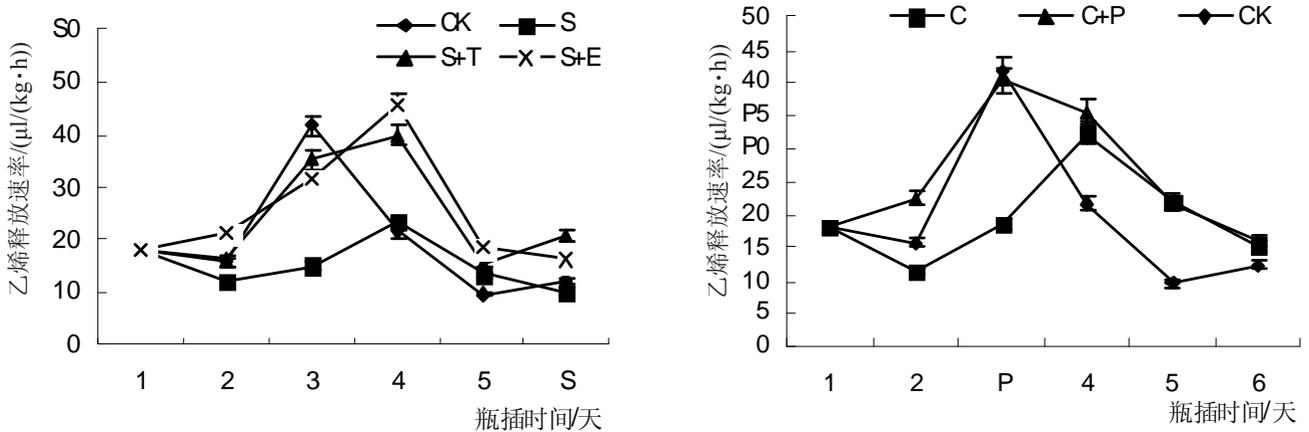


图3 不同处理后月季切花乙烯释放速率变化

2.3 不同处理对月季切花乙烯释放速率变化的影响

由图3可知,与对照相比,S处理的乙烯释放高峰推后1天,峰值比对照低43.94%,且除第1天外,其乙烯释放速率显著低于对照(P<0.05);S+E和S+T处理的高峰也比对照推后1天,而与S处理相比,除第1和第5天外,S+E和S+T处理的显著地高于S处理(P<0.05),其峰值比S处理分别高94.70%和70.65%。与C单独处理相比,C+P处理的跃变峰提前1天出现,而且其峰值较后者的高24.30%,在瓶插第1~4天,C+P处理的乙烯释放速率均高于对照,其中第2~3天达到极显著水平(P<0.01)。

2.4 不同处理对花瓣中LOX活性的影响

如图4所示,S处理的LOX活性与对照相比,除第1天外,均低于对照和其他处理,且在第4~5天差异显著(P<0.05);因此,外源NO处理可以抑制月季花瓣中的LOX活性,而加Ca<sup>2+</sup>螯合剂EGTA和CaM的抑制剂

TFP的处理却能逆转这一效应。C处理LOX活性变化趋势与对照相似,除瓶插当天外LOX活性均低于对照;加P处理后花瓣中的LOX活性又升高,且自瓶插第1天后,C+P处理的LOX活性均显著地高于C单独处理(P<0.05)。

2.5 不同处理对花瓣中ACS活性的影响

由图5可知,S处理ACS高峰出现在第3天,比对照推后1天,且除第1天外,S处理的ACS活性均显著低于对照和其他处理(P<0.05);S+T和S+E处理的ACS活性高峰也出现在第3天,比对照推后1天,其中S+T处理的酶活性(除第2天外)与对照差异不显著,而S+E处理的酶活性在第3~4天与对照的差异达极显著水平(P<0.01);相对于对照,C和C+P处理的ACS活性高峰均退后1天,而C处理峰值最低。因此,Ca<sup>2+</sup>和CaM可能参与了NO对切花瓶插期间ACS的活性调节。

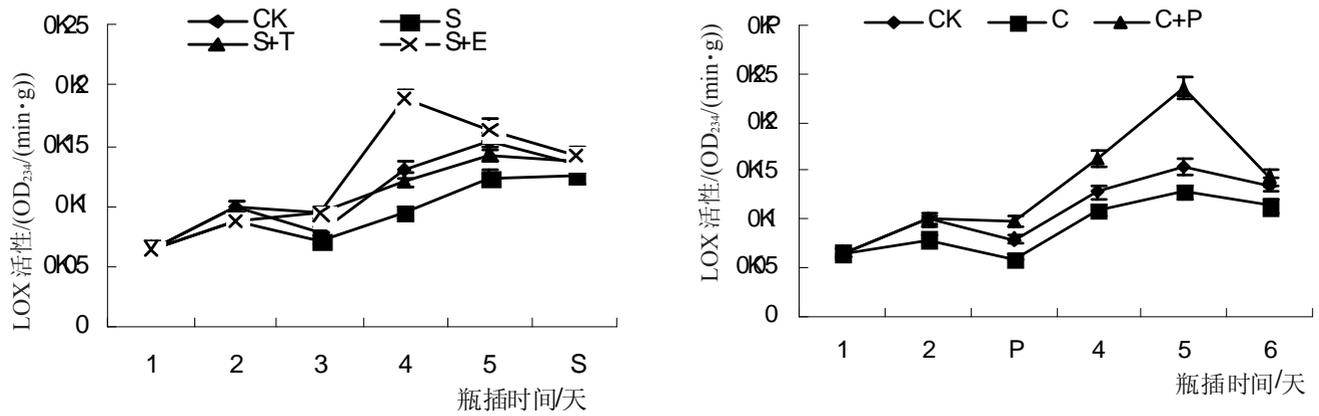


图4 不同处理后月季花瓣LOX活性变化

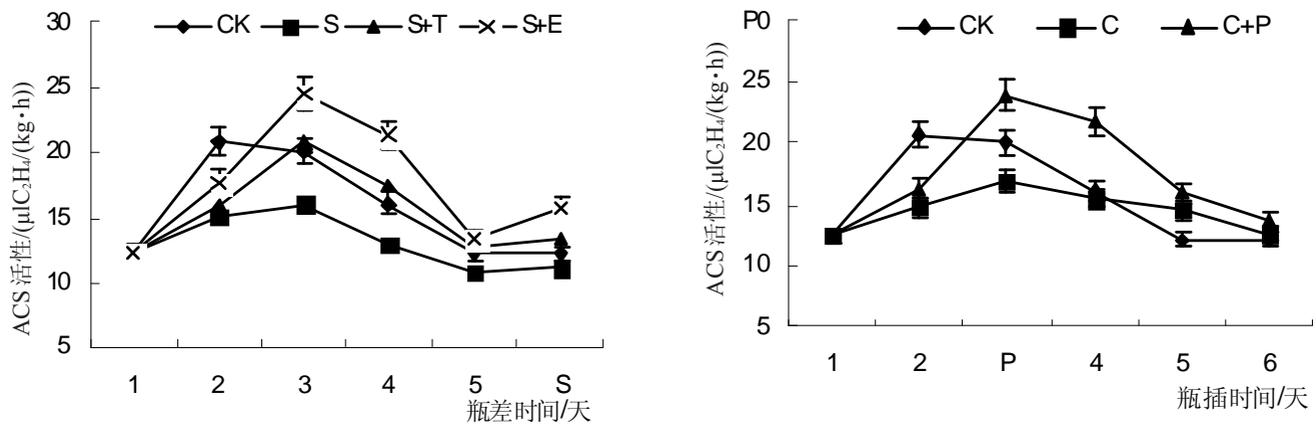


图5 不同处理后花瓣ACS活性变化

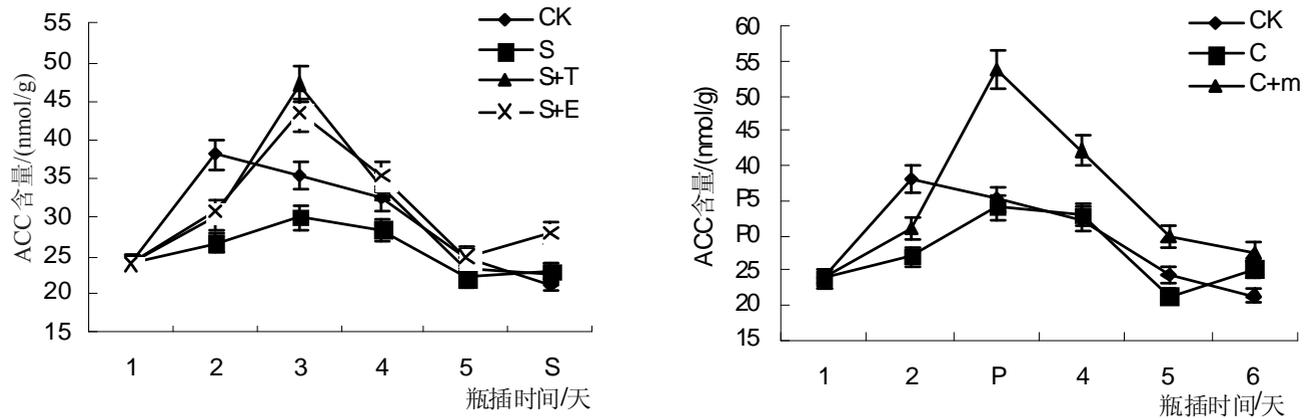


图6 不同处理后月季花瓣ACC含量变化

2.6 不同处理对月季花瓣中ACC含量的影响

如图6所示,S处理显著抑制和延缓ACC含量的升高,其高峰比对照推后1天,而S+T和S+T处理则可使其含量再次升高。C处理也能抑制ACC含量的上升,但C+P处理可以使ACC含量再次升高。因此,外源NO处理可以抑制切花瓶插期间ACC含量的上升,延缓高峰的出现,而加Ca<sup>2+</sup>螯合剂EGTA和CaM的抑制剂TFP处理却能使ACC含量再次升高。

2.7 不同处理对月季切花花瓣中ACO活性的影响

如图7表明,S处理的ACO活性在第4天达高峰,比对照推后1天;S+T和S+E处理的酶活性也于第4天达高峰,而其峰值显著高于S处理;与对照相比,C处理的ACO活性降低,高峰退后,而加P处理又逆转了这一效应。由此推测,Ca<sup>2+</sup>及CaM可能通过参与NO对植物内源乙烯合成中ACO活性的调节而调控切花的衰老。

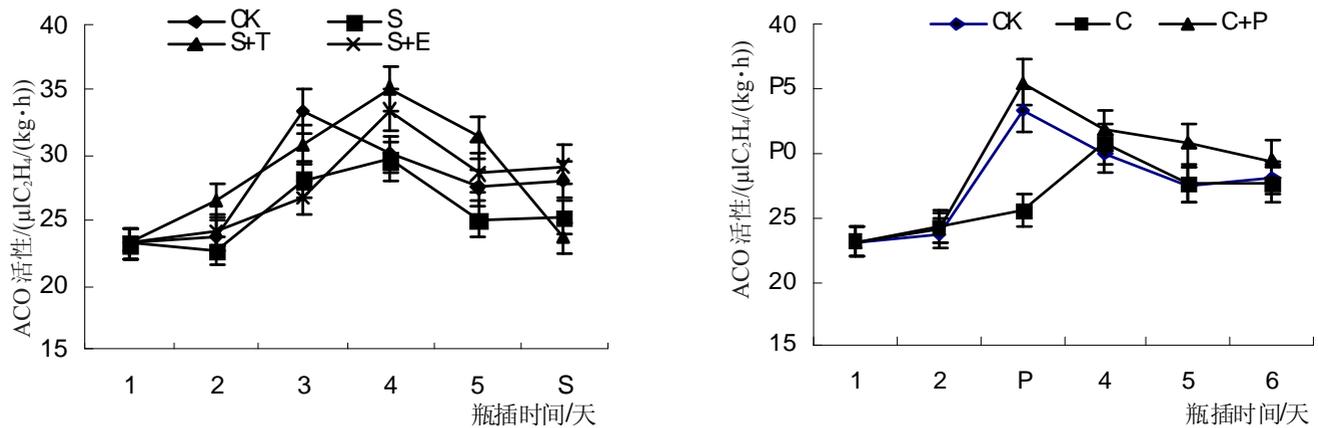


图7 不同处理后月季花瓣ACO活性变化

### 3 讨论

Ca<sup>2+</sup>可作为膜的稳定剂,抑制乙烯合成酶的活性,延缓膜的衰老过程,因而降低乙烯的生成<sup>[10]</sup>。笔者的研究表明,月季花瓣中检测到类似NOS活性,外源Ca<sup>2+</sup>处理可以调节花瓣中的NOS活性,即在月季花瓣中存在Ca<sup>2+</sup>/CaM依赖的NOS催化生成NO的途径。Ca<sup>2+</sup>处理能提高月季瓶插前期花瓣中的NOS活性,延缓切花衰老引起的NOS活性的降低,保持了衰老前期花瓣中的NO的较高水平,而又抑制了切花瓶插后期NOS活性的升高,从而抑制了由于NOS活性升高催化产生的高浓度NO的破坏作用,通过内源NO含量的变化间接地调控切花内源乙烯的生物合成。进一步的研究表明,Ca<sup>2+</sup>还参与了NO对月季花瓣中乙烯生物合成中相关酶类活性和物质含量的调节。

LOX可能是乙烯生物合成的上游调节因子,并在乙烯生物合成的系统I乙烯向系统II乙烯转变过程中起作用<sup>[11]</sup>。笔者的试验表明,外源NO处理可以抑制月季切花花瓣中的LOX活性,延缓切花的衰老,而加Ca<sup>2+</sup>螯合剂EGTA和CaM的抑制剂TFP的处理则可使花瓣中的LOX活性再次升高,似乎Ca<sup>2+</sup>及CaM参与了NO对LOX酶活性的调节,而在Ca<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>加NO清除剂处理的试验中发现,加清除剂PTIO处理可以抵消Ca<sup>2+</sup>单独处理降低花瓣中LOX活性的作用,因此,笔者推测Ca<sup>2+</sup>和NO对LOX活性的调节可能是在同一条途径作用的结果。

有证据表明,Ca<sup>2+</sup>可以抑制乙烯的生物合成。一方面,钙处理不仅降低组织ACC含量,而且抑制ACC氧化酶活性<sup>[12]</sup>;另一方面,高钙条件下,可能使苹果ACC向MACC的转化加强,反过来抑制了ACC向乙烯的转化<sup>[12]</sup>。此外,Ca<sup>2+</sup>对细胞壁和细胞膜的保护作用,保证了细胞内ACC与ACC氧化酶的区域性分隔,致使二者不能有效接触,抑制ACC氧化酶催化的ACC

向乙烯的转化,从而降低乙烯生成<sup>[11,13]</sup>。NO可以通过调控ACC合成酶的活性调节物质(生长素)及ACC氧化酶的辅助因子(抗坏血酸和Fe<sup>2+</sup>)而抑制乙烯的合成<sup>[14,15]</sup>,也可能是通过与乙烯受体的金属离子结合,抑制乙烯-受体复合物的形成,阻断乙烯所诱导的信号转导,从而抑制了乙烯的效应<sup>[16]</sup>。笔者的试验表明,外源NO处理既可抑制月季切花乙烯合成中关键酶ACS的活性,减少关键酶ACO催化的底物ACC的产量,同时又降低了ACO的活性,从而抑制了乙烯的生物合成,加Ca<sup>2+</sup>螯合剂EGTA和CaM的抑制剂TFP处理却可使ACS和ACO活性升高,ACC的含量增加,从而加速了乙烯的生物合成;而NO的清除剂处理也可以抑制由于Ca<sup>2+</sup>处理导致的ACS和ACO的活性降低以及ACC的含量下降,因此,Ca<sup>2+</sup>和CaM可能参与了NO对切花衰老过程中乙烯合成调控,也有可能是参与NO对乙烯所诱导的信号转导的调节,同时,在Ca<sup>2+</sup>和CaM对衰老过程中的乙烯合成调控中需要一定水平的NO参与。除此之外,NO可以直接作用于鸟苷酸环化酶(cGC)而经由内源环化鸟苷酸(cGMP)信号途径,调控基因表达,响应组织衰老胁迫<sup>[17]</sup>,而在此信号途径中有Ca<sup>2+</sup>信号的参与;NO可以通过蛋白质硝酰化作用直接作用于钙离子通道,因此,Ca<sup>2+</sup>可能在NO不经由乙烯作用的切花衰老调控的信号下游发挥作用,具体的作用机制还有待于进一步研究。

### 4 结论

Ca<sup>2+</sup>处理能提高月季瓶插前期花瓣中的NOS活性,而减缓后期NOS活性的升高,保持了花瓣中NO的较高水平,又抑制了高浓度NO的破坏作用。进一步的研究表明,Ca<sup>2+</sup>可使花瓣中的ACS和ACO活性升高,ACC的含量增加,从而加速了乙烯的生物合成;同时,PTIO处理也可以抑制由于Ca<sup>2+</sup>处理导致的ACS和ACO的活性降低以及ACC的含量下降。因此,Ca<sup>2+</sup>和

CaM可能参与了NO对切花衰老过程中乙烯合成调控及其信号转导。

### 参考文献

- [1] Lara I, Vendrall M. ACC oxidase activation by cold storage on Passe-Crassane pears: Effect of calcium treatment [J]. *J Sci Food Agric*,1998,76:421-426.
- [2] Leshem Y Y, Freud-Silverberg M, Wurzburger J, et al. Ca<sup>2+</sup>: Calmodulin phytohormone-limited plant senescence control [M]. In Bopp M (ed). *Plant Growth Substances*. Berlin Springer Verlag,2001:159-168.
- [3] Leshem Y Y, Pinchasov Y. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea Americana* (Mill.) [J]. *Journal Experimental Botany*,2000,51(349):1471-1473.
- [4] Zhu S H, Liu M C, Zhou J. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*,2006,42(1):41-48.
- [5] Cho M J, Vaghy P L, Kondo R, et al. Reciprocal regulation of mammalian nitric oxide synthase and calcineurin by plant calmodulin isoforms [J]. *Biochemistry*,1998,37(45):15593-15597.
- [6] 苏梦云,吴祖洪. 柃木叶片中NO与硝酸盐还原系统关系的研究[J]. *林业科学研究*,2000,13(2):141-146.
- [7] 陈昆松,徐昌杰,许文平,等. 猕猴桃和桃果实脂氧合酶活性测定方法的建立[J]. *果树学报*,2003,20(6):436-438.
- [8] Woeste K E, Chen Y, Kieber J J. Two *Arabidopsis* mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase [J]. *Plant Physiology*,1999,119:521-530.
- [9] 李富军,翟衡,杨洪强,等. 1-MCP对苹果果实贮藏期间乙烯合成代谢的影响[J]. *中国农业科学*,2004,37(5):734-738.
- [10] Leshem Y Y, Sridhara S, Thompson J E. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of pea foliage [J]. *Plant Physiology*,1984,75:329-335.
- [11] Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway [J]. *Annual Review of Plant Biology*,2002,53:275-297.
- [12] 关军锋. 采后钙处理对金冠苹果乙烯、超氧化物歧化酶活性和蛋白质含量的影响[J]. *应用基础和工程科学学报*,1997,5:252-256.
- [13] Chevery J L, Pouliquen J, Guyader H L E, et al. Calcium regulation of exogenous and endogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid bioconversion to ethylene [J]. *Physiol Plant*,1988,74:53-57.
- [14] Leshem Y Y, Haramaty E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage [J]. *J Plant Physiol*,1996,148:258-263.
- [15] 朱树华,周杰,束怀瑞. 植物中一氧化氮与园艺产品的成熟和衰老 [J]. *植物生理学通讯*,2004,40(6):733-740
- [16] 刘孟臣,宋卫红,朱树华,等. 一氧化氮和外源乙烯处理对肥城桃果实乙烯生物合成的影响. *中国农业科学*,2007,40(11):2582-2586.
- [17] Leshem Y Y, Wills R, Ku V. Applications of nitric oxide (NO) for postharvest control [J]. *Acta Hort*,2001,553:571-575.