

外源钙缓解花生低温光合障碍的调控机制

刘欣悦, 刘轶飞*, 易伯涛, 孙志宇, 张思威, 马明珠, 韩晓日
(土肥高效利用国家工程研究中心/沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要: 【目的】北方春季低温冷害是限制花生生产的主要环境因素之一, 钙素营养可提升花生耐冷性和光合碳同化作用, 本研究进一步探究外源钙缓解花生低温光合障碍的调控机制。【方法】以花生品种‘小白沙’为试验材料, 在人工气候室内进行了盆栽培养试验。设常温喷清水对照(夜温/昼温为 20℃/28℃, 幼苗叶面喷清水); 在低温胁迫(夜温/昼温为 9℃/15℃)下, 分别设幼苗叶面喷清水(+H₂O)、喷 15 mmol/L CaCl₂ (+Ca)、喷施钙抑制剂(+EGTA)处理, 共 4 个处理。将真叶展开一周的花生幼苗栽于盆中, 连续两天进行叶面喷施处理, 然后在低温胁迫下生长 7 天, 恢复常温后再生长 7 天, 共培养 14 天。于低温和常温处理期间, 测定花生幼苗生长发育、光化学活性、非结构型碳水化合物以及活性氧积累。【结果】低温胁迫抑制花生生长, 导致叶片非结构型碳水化合物和活性氧(ROS)过量积累, 同时造成严重的光损伤, 表现为调节性能量耗散的量子产量 Y(NPQ) 和非调节性能量耗散的量子产量 Y(NO) 显著上升, PSI 和 PSII 实际量子产量显著降低。外源 Ca²⁺增加了花生幼苗株高、叶面积和叶绿素含量, 也显著缓解了低温依赖性光损伤, 避免了叶片中非结构型碳水化合物的过量积累, 增强了花生光合作用水平; 外源 Ca²⁺有效降低了 ROS 过量积累, 有效保护光合机构。【结论】低温胁迫及恢复常温过程中, 外源 Ca²⁺可以通过有效激发花生生长发育和光化学活性, 维持叶片中非结构型碳水化合物有效外运, 降低非结构型碳水化合物和 ROS 过度积累, 全面缓解低温对花生产生的光抑制。

关键词: 花生; 低温胁迫; 光抑制; 活性氧; 钙

Foliar calcium application alleviates cold stress-induced photosynthetic inhibition in peanut

LIU Xin-yue, LIU Yi-fei*, YI Bo-tao, SUN Zhi-yu, ZHANG Si-wei, MA Ming-zhu, HAN Xiao-ri
(National Engineering Research Center for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources/College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: 【Objectives】Chilling damage in early spring is one of the main environmental limiting factors in peanut production in northern China. Calcium has been proven to enhance chilling tolerance and photosynthetic carbon fixation in peanut, hence, we investigated the regulatory mechanisms underlying the alleviation effect of exogenous Ca to low temperature stress in peanut. 【Methods】Peanut cultivar ‘Xiaobaisha’ was used as the experimental material in the study conducted in an artificial climate chamber. The control room temperature was 20°C/28°C (night/day) with foliar spraying of ultrapure water. The low temperature stress was set as 9°C/15°C, with foliar spraying of ultrapure water (+H₂O), 15 mmol/L CaCl₂ (+Ca), or 5 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid (+EGTA). At one week of true leaf expansion, the peanut seedlings were grown in the vessels and foliar spray was treated for two consecutive days, then treated under low temperature stress for 7 days, followed by normal temperature for 7 days. The plant growth, photochemical activity, non-structural carbohydrates and reactive oxygen species accumulation were measured. 【Results】Low temperature stress inhibited peanut growth, leading to excessive accumulation of non-structural carbohydrates and reactive oxygen species (ROS) in peanut leaves. The low temperature stress also caused severe photo-damage such as significant increments of

收稿日期: 2021-07-28 接受日期: 2021-10-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772391, 31301842); 国家花生产业体系岗位科学家项目(CARS-13)。

联系方式: 刘欣悦 E-mail: 18604205722@163.com; *通信作者 刘轶飞 E-mail: liuyifei@syau.edu.cn

regulated-energy dissipation [Y(NPQ)] and unregulated energy dissipation [Y(NO)], and decrements of the unregulated energy dissipation of PSI [Y(I)] and PSII [Y(II)]. Exogenous Ca^{2+} enhanced plant height, leaf area and relative chlorophyll concentration of peanut seedlings, and also significantly alleviated low temperature-induced photodamage, reduced excessive accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, and enhanced photosynthesis in peanut. Further, exogenous Ca^{2+} reduced the excessive accumulation of ROS and protected photosynthetic apparatus effectively. **【Conclusions】** During low temperature stress and normal temperature recovery, exogenous Ca^{2+} can alleviate chilling-induced photo-inhibition by effectively stimulating peanut growth and photochemical activities, maintaining non-structural carbohydrates efflux, and reducing excessive accumulation of non-structural carbohydrates and ROS.

Key words: peanut; chilling stress; photo-inhibition; reactive oxygen species; calcium

起源于南美洲热带地区的喜温作物—花生 (*Arachis hypogaea*) 是世界重要的油料和经济作物, 也是重要的食用蛋白源和食用植物油源, 在保障我国食用油安全方面具有举足轻重的作用^[1]。特别是, 基于后疫情时代“双循环”新发展格局下、中国大豆产需缺口加大等背景下, 中央明确了油料作物结构调整主要策略之一, 就是多措并举发展国内花生生产替代大豆进口。因此, 我国油料作物供给(食用油)安全和国际新形势新挑战已然将花生的优化施肥技术与耐冷优质高效生产推到一个前所未有的国家战略安全高度^[2]。

辽宁省是我国重要的优质花生出口基地和产区之一, 花生在辽宁省大田作物中其种植面积仅次于玉米和水稻。辽宁省土壤中黄曲霉菌含量极低, 辽宁产区的花生(黄曲霉毒素显著低于其他产区)完全符合出口创汇的优级标准, 这一优势也使得“辽宁花生”在全国乃至全球花生产业中品牌效应强, 不可替代。低温是限制花生地理分布和生产的主要环境因子之一, 冷害在全球花生生产中普遍存在^[3], 在我国尤其以北方高纬度区域、南方高海拔地区为甚。研究表明, 大多数花生在幼苗期环境温度低于 $12^{\circ}\text{C} \sim 16^{\circ}\text{C}$ 时, 植株生长缓慢, 严重时停止生长, 叶片会出现脱水、萎蔫甚至枯死等现象^[4-5]。前人大量研究表明, 低温导致植物光合障碍, 生长发育停滞, 甚至死亡^[6]; 低温胁迫对植物生长发育和光合碳同化过程产生负面影响^[7]。研究发现, 低温胁迫显著降低了水稻、玉米、向日葵、高粱、苹果幼苗的叶面积^[8-9], 抑制了玉米根系生长和干物质积累等^[10]。低温胁迫可破坏光合作用的主要机构, 包括叶绿体的结构、类囊体膜功能、光合电子传递和气孔运动等^[11-12], 降低植物光合作用水平, 进而导致生物量降低、叶片坏死等问题^[13]。

钙素作为一种植物必需的矿质养分, 在维持细

胞壁和细胞膜的结构完整性和功能稳定性上具有多重作用, 同时钙离子作为信号物质在调节植物应对非生物胁迫中也发挥重要功能^[14]。虽然土壤中含有大量钙素, 但是作物在低温逆境下根系活力和叶片蒸腾速率骤降, 时常发生严重吸钙障碍^[15]。为此, 叶部抗寒增钙技术作为植物应对(寒)冷逆境的外源调控措施, 现已在水稻、玉米、番茄、苹果、黄瓜、烟草等作物上广泛应用^[16-18]。外源钙预处理有助于维持细胞膜的完整性和抗氧化系统的平衡, 从而减轻膜脂的过氧化反应^[19-20]。课题组前期研究发现, 叶面施钙具有显著提升花生耐冷性的调控效应^[12-13], 但是外源钙素的调控作用是否与解除低温光合障碍有关, 这有待于进一步探究。为此, 本试验应用人工气候室盆栽培养花生苗, 同时采用外源钙离子(钙素正向调控)及其钙抑制剂 EGTA(钙素负向调控)对花生苗进行预处理, 从正反两方面深入探讨外源钙素对花生低温依赖性光合反馈抑制的调控作用, 这对于最终实现花生生产中科学施用钙肥, 以及进一步开发寒区花生高产优质施肥配套技术等具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2019 年在沈阳农业大学土地与环境学院人工气候室内进行, 人工气候室光合光子通量密度 (PPFD) 为 $600 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, CO_2 浓度为 $(400 \pm 5) \mu\text{mol}/\text{mol}$, 相对湿度为 $(60 \pm 5)\%$ 。

试验以东北主栽花生品种“小白沙”为材料, 利用 48 孔穴盘进行花生育苗, 待长出第一片真叶时选取 100 株长势均匀一致的花生苗移栽至直径为 13 cm 的圆柱盆中, 平均分为 4 个处理组: 1) CK (夜温/昼温 $20^{\circ}\text{C}/28^{\circ}\text{C}$ + 叶面喷施超纯水), 2) H_2O (夜温/昼温 $9^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ + 叶面喷施超纯水), 3) $+\text{Ca}$ (夜温/

昼温 9℃/15℃ + 叶面喷施 15 mmol/L CaCl₂), 4) +EGTA (夜温/昼温 9℃/15℃ + 叶面喷施 5 mmol/L EGTA)。待真叶展开一周后, 连续两天(下午 3: 00—4: 00) 分别喷施超纯水、15 mmol/L CaCl₂ 和 5 mmol/L EGTA 处理, 以上调控处理条件均为课题组前期筛选得出的最佳条件^[4, 12-13]。于叶面喷施试剂处理后的第二天夜晚开始, 模拟常见的花生苗期低温冷害情况, 低温持续处理 7 天。于第 7 天的夜间恢复常温 20℃, 继续生长 7 天, 整个试验处理周期为 14 天。

1.2 测定方法

1.2.1 生长指标的测定方法 各处理随机选取生长均一的 3 株花生, 于低温处理第 7 天和恢复常温后的第 7 天上午 9: 00—10: 00 测量生长指标。株高与茎粗分别利用直尺与游标卡尺测量, 叶面积和相对叶绿素含量 (SPAD 值) 分别利用 LI-3000C 叶面积仪和 CCM-200 plus 叶绿素仪测定。

1.2.2 光合及荧光参数的测定方法 光合和荧光参数分别在低温的第 1、4、7 天及其常温恢复过程中的第 1、4、7 天的上午 9: 00 开始测定, 每株选取“倒三叶”作为指定叶片, 各处理随机选取 3 株作为重复。光合气体交换参数采用 GFS-3000 (WALZCo., 德国) 测定, 其中瞬时水分利用率 (WUEt) 以及气孔限制值 (Ls) 参照以下公式计算:

$$WUEt = Pn/Tr$$

$$Ls = (C_a - C_i)100\%/C_a$$

式中, C_a 为大气 CO₂ 浓度, C_i 为胞间 CO₂ 浓度。

最大光化学效率 Fv/Fm、PSI 实际量子产量 Y (I)、PSI 电子传递速率 ETR (I)、供体侧限制引起的 PSI 处非光化学能量耗散的量子产量 Y (ND)、受体

侧限制引起的 PSI 处非光化学能量耗散的量子产量 Y (NA)、PSII 实际量子产量 Y (II)、PS II 电子传递速率 ETR (II)、PSII 处非调节性能量耗散的量子产量 Y (NO) 与 PSII 处调节性能量耗散的量子产量 Y (NPQ) 利用双通道叶绿素荧光仪 Dual-PAM-100 (WALZCo., 德国) 测定。

1.2.3 碳水化合物及活性氧含量的测定方法 在低温处理的第 7 天和恢复常温的第 7 天取样, 测定叶片碳水化合物和活性氧含量。各处理随机选取 3 株的倒三叶, 105℃ 杀青 30 min, 65℃ 烘干, 粉碎。葡萄糖、蔗糖、果糖、淀粉等含量测定参照薛应龙^[21]的方法。丙二醛 (MDA) 含量采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定, 过氧化氢 (H₂O₂) 含量的测定参照 Jana 等^[22]方法并加以改进。超氧阴离子的测定方法按照王爱国等^[23]的方法并加以改进。

1.3 数据分析

利用 Excel 2016 制表, Origin 2021 作图。采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析和最小显著差数法 (LSD) 检验, 结果以 3 次生物学重复的平均值和标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫及常温恢复条件下外源钙素对花生幼苗生长的影响

由表 1 可以看出, 在低温处理 7 天时, 喷施 H₂O 和 EGTA 处理株高显著低于 CK, 而喷施 Ca 处理与 CK 无显著差异; 而在恢复常温 7 天后, +H₂O、+Ca 和 +EGTA 3 个处理的株高之间无显著差异, 但均显著低于 CK。低温胁迫下, 喷施 H₂O 处理茎粗最大, 而恢复常温后, 施 Ca 处理茎粗最大, 喷施

表 1 低温胁迫 7 天 (L) 及恢复常温 7 天 (R) 时不同处理花生生长状况

Table 1 Peanut growth at 7 days of low temperature stress (L) and at 7 days after recovery to regular temperature (R)											
处理 Treatment	株高 (cm) Plant height		茎粗 (cm) Stem diameter		叶面积 (cm ²) Leaf area		SPAD		根冠比 Root to shoot ratio		
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	
CK	11.6±0.9 a	16.7±0.7 a	0.33±0.05 a	0.38±0.03 ab	4.3±0.2 a	5.6±0.4 a	28.2±0.4 a	31.0±1.5 a	0.40±0.03 c	0.42±0.05 b	
+H ₂ O	8.5±0.9 b	11.7±0.6 b	0.49±0.05 a	0.42±0.01 ab	2.1±0.4 b	3.2±0.2 b	24.4±1.3 b	29.0±1.0 a	0.61±0.02 a	0.49±0.01 ab	
+Ca	10.2±0.6 ab	12.5±1.7 b	0.43±0.04 a	0.43±0.04 a	3.0±0.2 b	3.8±0.4 b	24.5±1.2 b	29.6±0.6 a	0.52±0.03 b	0.47±0.00 ab	
+EGTA	7.6±1.0 b	9.5±1.2 b	0.34±0.05 a	0.33±0.02 b	2.5±0.4 b	3.2±0.5 b	22.3±0.4 b	22.9±0.9 b	0.60±0.01 a	0.55±0.03 a	

注: 低温胁迫时昼/夜温度为 9℃/15℃, 常温时昼/夜温度为 20℃/28℃; CK—无低温胁迫。数据为 3 次生物学重复的平均值。同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The chilling stress is 9℃/15℃, and regular temperature is 20℃/28℃ at day/night; CK—Without low temperature stress. The data is the mean value of three replicates ($n=3$). Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

EGTA 处理最小。对照叶面积在低温胁迫和恢复常温后均最大, 其他 3 个处理低温下无明显差异, 但喷施 Ca 处理比施 H₂O 和 EGTA 处理分别高 42.9% 和 22.6%。低温胁迫显著降低了相对叶绿素含量 SPAD, 而恢复常温后, 除了喷施 EGTA 处理 SPAD 值显著低于 CK 之外, 其余处理与 CK 差异不显著。低温胁迫下, 喷施 Ca 处理的根冠比虽然显著高于 CK, 但显著低于喷施 H₂O 和 EGTA 处理; 恢复常温后, 喷施 EGTA 处理的根冠比依然显著高于 CK。

2.2 低温胁迫及常温恢复条件下外源钙素对花生叶片光合气体交换水平的影响

从图 1 可以看出, 低温处理及恢复常温期间, 净光合速率 (Pn) 整体呈先下降后上升逐渐趋于平缓的趋势, 在低温胁迫 7 天时, 喷施 Ca 和施 H₂O 处理 Pn 低于 CK, 但高于喷施 EGTA 处理; 恢复常温 7 天后, 喷施 Ca 处理的 Pn 与 CK 无显著差异。细胞间二氧化碳浓度 (Ci) 随着低温胁迫天数的增加, 整体呈先增长后下降的趋势。低温胁迫下喷施 EGTA

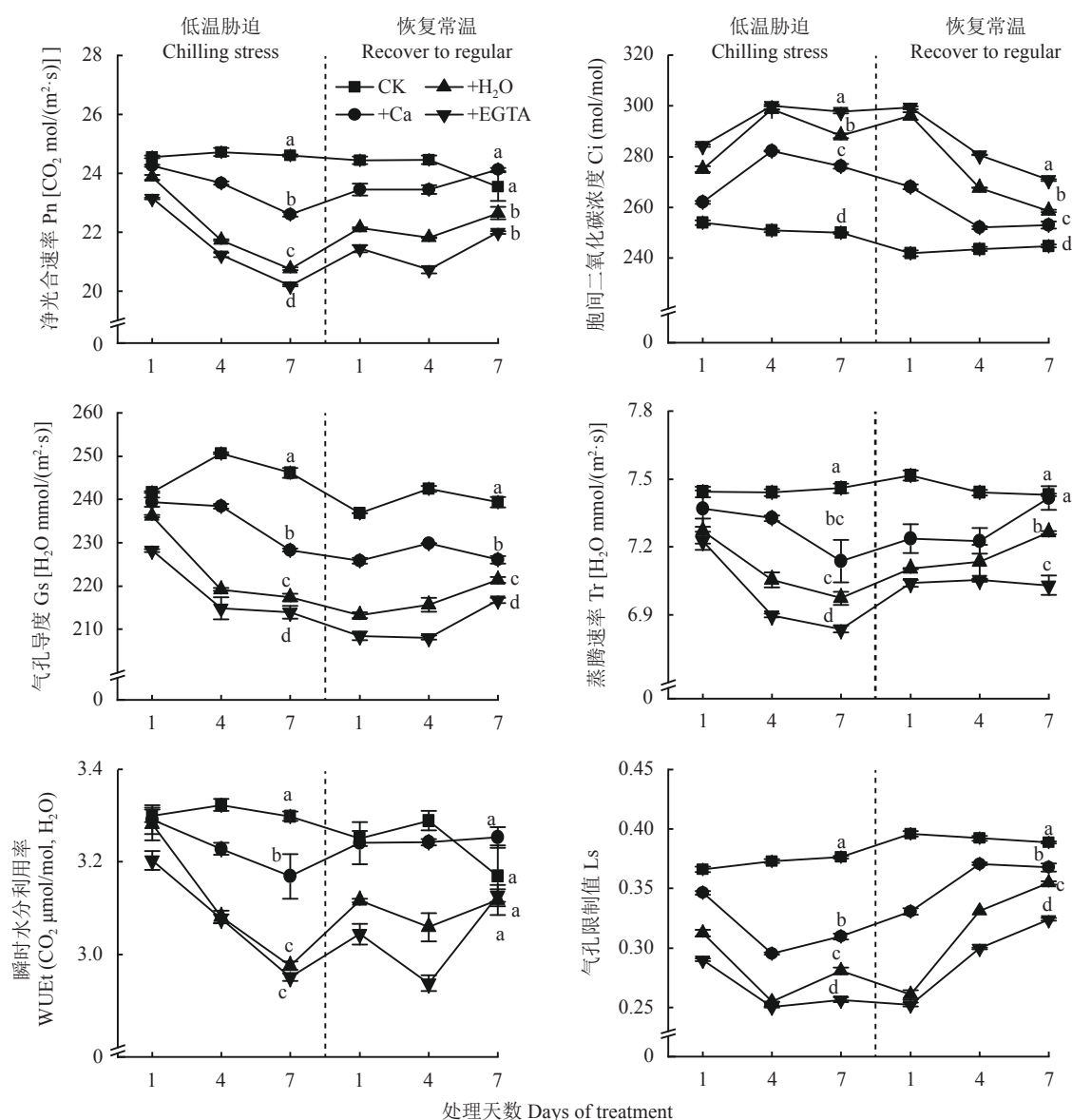


图 1 低温胁迫及恢复常温后各处理花生气体交换参数

Fig. 1 Leaf gas exchange parameters at different days of chilling stress and recovery to normal temperature under different treatments

注: 低温胁迫时昼/夜温度为 9℃/15℃, 常温时昼/夜温度为 20℃/28℃。CK—无低温胁迫。线旁不同小写字母表示相同处理天数不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The chilling stress is 9℃/15℃, and regular temperature is 20℃/28℃ at day/night. CK—Without low temperature stress. Different lowercase letters beside the line indicate significant difference among different treatments on the same day ($P < 0.05$).

处理的气孔导度 (Gs) 最低, 喷施 Ca 处理与 CK 差异最小, 恢复常温后, 喷施 H₂O 与喷施 EGTA 处理 Gs 有增加趋势。蒸腾速率 (Tr) 随低温胁迫天数增加逐渐降低, 恢复常温后逐渐趋于平稳, 喷施 Ca 处理 Tr 值与 CK 无显著差异。瞬时水分利用率 (WUEt) 随低温胁迫天数增加逐渐降低, 恢复常温后逐渐趋于平稳, 低温胁迫下, 以喷施 Ca 处理最大。低温处理及恢复常温期间, 气孔限制值 (Ls) 整体呈先下降后上升的趋势, 低温胁迫 1~4 天快速下降, 恢复常温后上升趋势明显。综上, 随着低温胁迫时间的延长, 花生叶片 Pn、Gs、Tr 也逐渐降低, Ci 逐渐上升, 恢复常温 7 天后, 喷施 Ca 处理的 Pn、Tr、WUEt 与 CK 无显著差异。

2.3 低温胁迫及常温恢复条件下外源钙素对花生最大光化学效率 Fv/Fm 的影响

图 2 表明, PSII 最大光化学效率 Fv/Fm 随着低温胁迫时间的延长呈现逐渐降低趋势, 3 个低温处理变化趋势相似, 随低温胁迫时间延长, 喷施 EGTA 处理 Fv/Fm 下降速率最大, 喷施 H₂O 和喷施 Ca 处理 Fv/Fm 下降的趋势与喷施 EGTA 处理相比较为缓慢; 在低温胁迫第 7 天, 3 个低温处理与 CK 相比有显著差异, 其中施 Ca 处理 Fv/Fm 大于喷施 H₂O 和

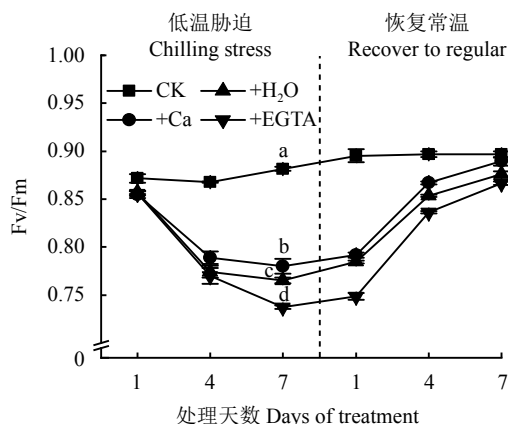


图 2 低温胁迫及其常温恢复条件下各处理花生叶片 PSII 最大光化学效率 (Fv/Fm)

Fig. 2 The maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) in peanut leaves at different days of chilling stress and recovery to normal temperature under different treatments

注: 低温胁迫时昼/夜温度为 9℃/15℃, 常温时昼/夜温度为 20℃/28℃。CK—无低温胁迫。线旁不同字母表示相同处理天数不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The chilling stress is 9℃/15℃, and regular temperature is 20℃/28℃ at day/night. CK—Without low temperature stress. Different letters beside the line indicate significant difference among different treatments on the same day ($P < 0.05$).

EGTA 处理; 在恢复常温的 1~4 天, 除 CK 外的 3 个处理 Fv/Fm 呈快速上升的趋势, 喷施 Ca 处理在恢复常温第 7 天 Fv/Fm 恢复到 CK 水平。

2.4 低温胁迫及常温恢复条件下外源钙素对花生叶片 PSI 和 PSII 光化学活性的影响

由图 3 可以看出, 低温胁迫 1~7 天时, +H₂O、+Ca 和 +EGTA 3 个处理的 Y (I) 和 ETR (I) 都显著降低, 但喷施 Ca 处理降低最少; 恢复常温后, +H₂O、+Ca 和 +EGTA 3 个处理的 Y (I) 和 ETR (I) 均呈上升趋势, 且在恢复常温后的 1~4 天 ETR (I) 增加速率最大。在低温胁迫 1~7 天时, Y (ND) 和 Y (NA) 呈上升的趋势, 其中施 Ca 处理的 Y (ND) 最大, CK 最小。Y (II) 和 ETR (II) 总体趋势与 Y (I) 和 ETR (I) 相似, 其中在 1~4 天的低温胁迫期间 ETR (II) 下降速率最大, Y (II) 在恢复常温第 7 天时达到 CK 水平。随着低温胁迫时间延长, Y (NO) 显著上升, 喷施 H₂O 和 EGTA 处理的 Y (NPQ) 与 Y (NO) 高于施 Ca 处理, 低温条件下的 +H₂O、+Ca 和 +EGTA 3 个处理间差异显著。

2.5 低温胁迫及常温恢复条件下外源钙素对花生叶片非结构性碳水化合物积累的影响

由图 4 可以看出, 在低温处理 7 天时, 葡萄糖含量 +Ca 处理显著高于其他处理, +H₂O 和 +EGTA 处理显著低于对照; 在常温恢复 7 天, +H₂O、+Ca 和 +EGTA 显著低于对照。与 CK 相比, 3 个低温处理的蔗糖含量显著增加。在恢复常温后, 蔗糖含量都大幅度降低, 其中 +Ca 处理与对照最相近。胁迫 3 个低温处理叶片果糖含量明显高于对照, 其中 +Ca 处理最高, 其次为 +H₂O 和 +EGTA 处理。恢复常温 7 天, 果糖含量大幅度降低, 但处理间仍存在显著差异, 以 +EGTA 处理的果糖含量最高。低温胁迫下 +H₂O 处理淀粉含量最高, +Ca 处理与对照无显著差异, 恢复常温后淀粉含量增加, +Ca 处理与对照无显著差异。

2.6 低温及常温恢复条件下外源钙素对花生叶片活性氧积累的影响

在低温胁迫第 7 天时, 喷施 EGTA 处理的超氧阴离子 (O_2^-) 产生速率最高, CK 最低。在恢复常温第 7 天时, 喷施 Ca 处理的 O_2^- 产生速率最低 (图 5)。与 CK 相比, 低温胁迫的第 7 天低温处理组过氧化氢含量都显著增加, 其中喷施 H₂O 处理 H₂O₂ 含量最大; 在恢复常温第 7 天过氧化氢含量降低, 其中 CK 最小, 喷施 EGTA 处理最大, 喷施 H₂O 和 Ca 处

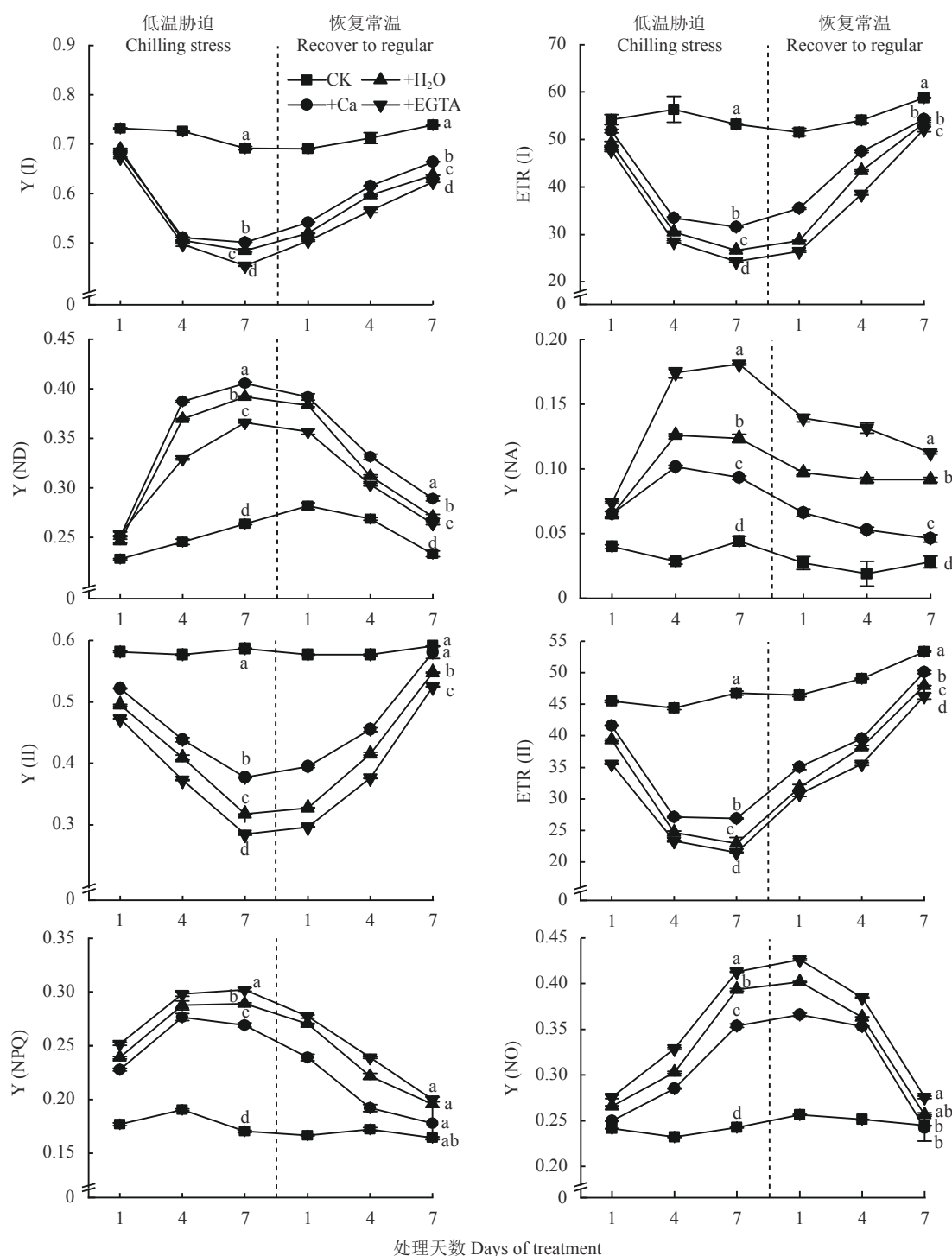


图3 低温胁迫及其常温恢复条件下各处理花生叶片 PSI 和 PSII 光化学活性

Fig. 3 PSI and PSII photochemical activities in peanut leaves at different days of chilling stress and recovery to normal temperature under different treatments

注：低温胁迫时昼/夜温度为 9℃/15℃，常温时昼/夜温度为 20℃/28℃。CK—无低温胁迫。Y—产量；ETR—电子传递速率；ND—供体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子；NA—受体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子；NO—非调节性能量耗散的量子；NPQ—调节性能量耗散的量子。线旁不同字母表示相同处理天数不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The chilling stress is 9℃/15℃, and regular temperature is 20℃/28℃ at day/night. CK—Without low temperature stress; Y—Yield; ETR—Electronic transmission rate; ND—Quantum of non-photochemical energy dissipation caused by donor-side confinement; NA—Quantum of non-photochemical energy dissipation induced by receptor-side confinement; NO—Unregulated energy dissipation; NPQ—Regulated-energy dissipation; I —PS I; II —PS II. Different letters beside the line indicate significant difference among different treatments on the same day ($P < 0.05$).

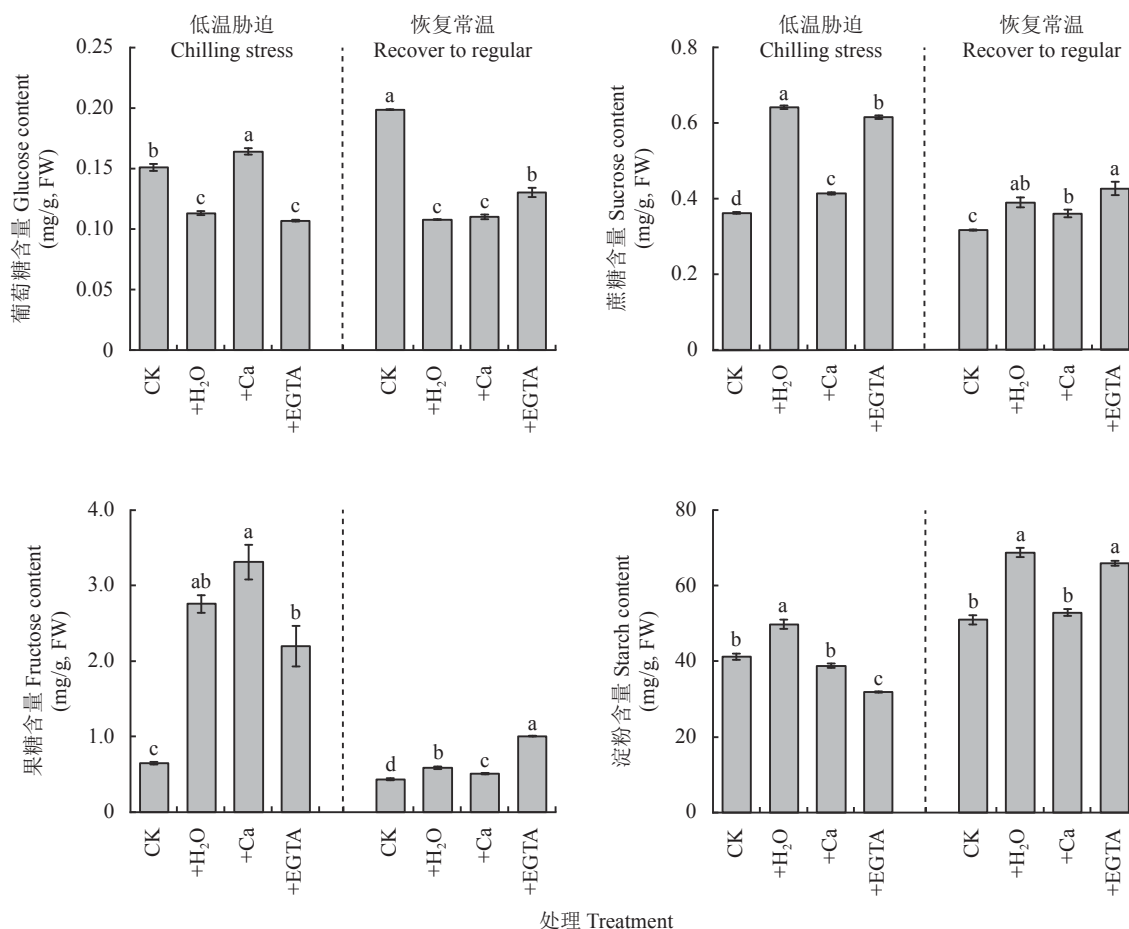


图4 低温胁迫7天及恢复常温7天各处理花生叶片非结构性碳水化合物积累量

Fig. 4 Non-structural carbohydrate accumulation in peanut leaves at 7 days of chilling stress and recovered to regular temperature under different treatments

注: 低温胁迫时昼/夜温度为 9℃/15℃, 常温时昼/夜温度为 20℃/28℃。CK—无低温胁迫。方柱上不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The chilling stress is 9℃/15℃, and regular temperature is 20℃/28℃ at day/night. CK—Without low temperature stress. Different letters above the bars indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

理之间无显著差异。低温处理组中的丙二醛含量显著高于 CK, 3 个低温处理之间无显著差异 ($P < 0.05$)。在恢复常温后, 经过低温的处理丙二醛含量普遍降低; 特别是+Ca 的丙二醛含量显著低于其他处理的丙二醛含量。

3 讨论

低温影响植物的生长发育, 减少生物量积累, 低温胁迫严重时造成不可逆伤害。花生属于典型喜温作物, 低温环境显著影响花生生长发育, 甚至造成缺苗断垄、空壳减产, 导致严重经济损失。很多研究表明, 在逆境条件下外源钙能有效提升气孔导度和净光合速率等^[23-24]; 同时也可提升 Rubisco^[25] 与 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶的活性、增强类囊体中电

子传递速率等进而增强光合效率^[26]。本研究表明, 低温胁迫下与喷施 H₂O 相比, 叶面喷施外源 Ca²⁺增加了花生株高、叶面积和叶绿素含量, 也显著缓解了低温依赖性光损伤; 有效缓解了花生叶片中非结构性碳水化合物的过量积累, 增强了光合能力; 有效降低了 O₂⁻、H₂O₂ 和丙二醛的过量积累, 保护了光合机构。前人研究表明, 外源 Ca²⁺间接缓解了夜间低温胁迫造成的 Gs 和 Tr 的骤降, 维持了 Ci, 防止了 Pn 的下降, Ca²⁺改善了光合碳水化合物在韧皮部的装载和转运等, 外源 Ca²⁺可以显著修复低夜温造成的光合膜损伤, 缓解番茄、苹果、烟草、花生等植物的光系统损伤, 特别是缓解 PSI 光抑制^[27-28]。以往的观点认为, 植物 PSI 比 PSII 更稳定而不易受到光损伤, 然而新的研究表明, PSI 复合物基质侧的铁硫

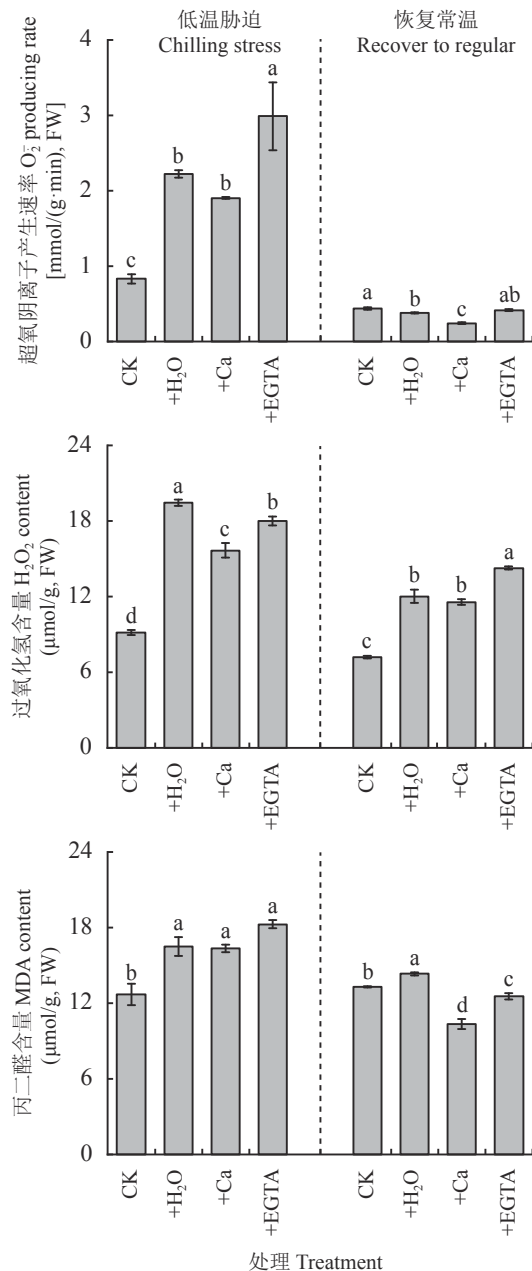


图5 低温胁迫7天及恢复常温7天各处理花生叶片活性氧积累量和丙二醛含量

Fig. 5 The reactive oxygen accumulation and MDA content in peanut leaves at 7 days of chilling stress and recovered to regular temperature under different treatments

注：低温胁迫时昼/夜温度为9°C/15°C，常温时昼/夜温度为20°C/28°C。CK—无低温胁迫。方柱上不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The chilling stress is 9°C/15°C, and regular temperature is 20°C/28°C at day/night. CK—Without low temperature stress. Different letters above the bars indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

簇极易受到光系统中活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的破坏^[29-30]，尤其是波动光强和光强

—温度交叉胁迫下PSI的光损伤更为严重，甚至PSI的光损伤要早于PSII。本研究发现，外源Ca²⁺有效缓解了低温胁迫对花生生长的不利影响，特别是有效减缓了Fv/Fm的降低，这说明外源Ca²⁺有效恢复了低温条件下花生叶片PSII的功能，降低了叶片中蔗糖的积累，降低活性氧带来的损伤，有效提高了花生叶片的光合活性^[31]。

前人研究表明，植物可溶性碳水化合物的积累在冬季抗寒生存中起着重要的作用^[32]，通常蔗糖是在低温条件下积累的游离糖^[33]，另有国内外学者认为过多的碳水化合物积累使光合碳同化作用水平降低，并认为造成生物量减少的原因是碳水化合物的反馈抑制作用^[34]。本研究发现，低温胁迫使花生幼苗叶片中蔗糖、果糖及淀粉大量积累，Pn降低，ETR1和ETR2下降；喷施外源Ca²⁺减缓蔗糖、果糖、淀粉等的过度积累，减缓了ETR和Pn的降低，说明喷施Ca²⁺可减缓由非结构型碳水化合物过度积累造成的光合效率降低，从而提高了低温胁迫下花生叶片的光合能力。Zhou等^[35]、何洁等^[36]研究认为，形成的大量淀粉粒会改变二氧化碳向细胞内扩散的途径，影响叶绿体中二氧化碳的吸收与运输使光合效率降低，出现光合速率和呼吸速率降低、同化物质运转缓慢等应激反应，导致淀粉及可溶性糖的过度积累。由我们低温胁迫后的恢复常温的实验结果可知，花生叶片中蔗糖、葡萄糖和果糖含量都显著降低，淀粉含量依旧较高；外源施Ca²⁺处理有效降低非结构型碳水化合物积累量，并可恢复至对照水平。低温阻碍叶片中蔗糖的运输，大量非结构型碳水化合物的堆积会显著抑制光合碳同化过程^[37-38]，这是使光合作用下降的主要原因之一；磷酸丙糖转化成更多的淀粉，淀粉来不及转化为蔗糖向外运出，导致蔗糖外运受到阻碍，进而叶片中积攒大量淀粉^[39-41]，最终产生严重的抑制作用。

有研究表明，碳水化合物与活性氧的关系密不可分，认为碳水化合物中的某些可溶性糖是活性氧代谢系统中重要的成分，可使植物抵抗过氧化损伤^[42]，也有研究表明活性氧的积累会上调可溶性糖的积累，从而适应非生物胁迫^[43]，活性氧在植物发育和生长过程及胁迫环境中起到调节作用，是不同胁迫与植物发育和生长控制之间的重要联系^[44-46]。本试验结果显示，在低温胁迫后O₂⁻产生速率、H₂O₂含量以及MDA含量显著增加，这与罗娅等^[47]研究结果一致，外源钙有效降低了O₂⁻、H₂O₂和丙二醛的大量积累，降低了光合机构的损伤。Ca²⁺在应对非生物胁迫及调

节胞内信号也起着重要作用, 可以抑制植物细胞膜脂过氧化, 减轻活性氧的毒害作用。钙和 ROS 最初被认为是相互作用的, 因为钙直接或者间接地对 RBOHs(植物爆发式氧化酶, 活性氧的主要来源) 产生负调控, 并可通过激活/抑制激酶/磷酸酶活性介导钙通道的开闭^[48]。本试验结果显示, 外源 Ca^{2+} 有效缓解 ROS 大幅度增加, 喷施钙离子抑制剂 (EGTA) 会显著增加 O_2^- 产生速率, 进而反向证明了 Ca^{2+} 可有效降低活性氧的产生。在低温下 ROS 水平升高, ROS 从源头抑制了蛋白质的合成, 特别抑制了 D1 蛋白的合成, D1 蛋白是光系统 II 反应中心的组成部分^[49]。在不利于 CO_2 固定的环境条件下, 光合色素吸收过多的光能会抑制光损伤 PSII 的修复, 从而增加光抑制的程度。因此, ROS 不仅抑制 PSII 蛋白的合成, 而且抑制 PSII 修复速率^[50-51]。此外, 钙可以稳定脂质层的基本结构, 通过调节自身浓度减少 ROS 对膜脂过氧化损伤^[52]。恢复常温后, 喷施钙处理花生叶片丙二醛含量迅速下降^[53], 说明低温胁迫及其恢复过程中, 叶面喷施 Ca^{2+} 有助于降低花生叶片丙二醛含量, 增加植株冷适应性。

4 结论

低温胁迫及其恢复过程中, 外源 Ca^{2+} 可以有效提升花生生长发育和光合作用水平, 显著降低非结构型碳水化合物和 ROS 的过度积累, 全面缓解低温光抑制。

参 考 文 献:

- [1] Lambers H, de Britto Costa P, Oliveira R, Silveira F A O. Towards more sustainable cropping systems: Lessons from native *Cerrado* species[J]. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 2020, 32: 175–194.
- [2] 万书波. 我国花生生产面临的机遇与科技发展战略[J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(1): 7–12.
Wan S B. Opportunities and development strategies of science and technology for peanut industry in China[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, 11(1): 7–12.
- [3] Jeammuangpuk P, Promchote P, Duangpatra J, *et al.* Enhancement of Tainan 9 peanut seed storability and germination under low temperature[J]. *International Journal of Agronomy*, 2020, 9: 8813285.
- [4] Liu Y F, Han X R, Zhan X M, *et al.* Regulation of calcium on peanut photosynthesis under low night temperature stress[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013, 12(12): 2172–2178.
- [5] Zhang G X, Liu Y F, Ni Y, *et al.* Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): 1–12.
- [6] Powles S. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35(1): 15–44.
- [7] 吴雪霞, 陈建林, 查丁石. 低温胁迫对茄子幼苗叶片叶绿素荧光特性和能量耗散的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(1): 164–169.
Wu X X, Chen J L, Zha D S. Effects of low temperature stress on chlorophyll fluorescence characteristics and energy dissipation of eggplant seedling leaves[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2009, 15(1): 164–169.
- [8] Ramazan S, Qazi H A, Dar Zahoor A, *et al.* Low temperature elicits differential biochemical and antioxidant responses in maize (*Zea mays*) genotypes with different susceptibility to low temperature stress[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(6): 1395–1412.
- [9] Li L, Su H, Ma H, *et al.* Differential proteomic analysis reveals the effect of calcium on *Malus baccata* Borkh. leaves under temperature stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1755.
- [10] Wang Y, Li J, Gu W R, *et al.* Exogenous application of 5-aminolevulinic acid improves low-temperature stress tolerance of maize seedlings[J]. *Crop & Pasture Science*, 2018, 69: 587–593.
- [11] Allen D J, Ort D R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(1): 36–42.
- [12] Song Q B, Liu Y F, Pang J Y, *et al.* Supplementary calcium restores peanut (*Arachis hypogaea*) growth and photosynthetic capacity under low nocturnal temperature[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1637.
- [13] Wu D, Liu Y F, Pang J Y, *et al.* Exogenous calcium alleviates nocturnal chilling-induced feedback inhibition of photosynthesis by improving sink demand in peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020.
- [14] Ma M Z, Liu Y F, Bai C M, *et al.* The physiological functionality of PGR5/PGRL1-dependent cyclic electron transport in sustaining photosynthesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 702196.
- [15] 由继红, 陆静梅, 杨文杰. 钙对低温胁迫下小麦幼苗光合作用及相关生理指标的影响[J]. *作物学报*, 2002, 28(5): 693–696.
You J H, Lu J M, Yang W J. Effects of calcium on photosynthesis and related physiological indexes of wheat seedlings under low temperature stress[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28(5): 693–696.
- [16] 徐国华, 沈其荣, 潘文辉, 等. 叶面营养对黄瓜生物效应的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 1997, 3(1): 36–42.
Xu G H, Shen Q R, Pan W H, *et al.* Effects of foliar nutrition on the biological effects of cucumber [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 1997, 3(1): 36–42.
- [17] Hochmal A K, Schulze S, Trompelt K, *et al.* Calcium-dependent regulation of photosynthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2015, 1847(9): 993–1003.
- [18] 李艳梅, 廖上强, 张琳, 等. 喷施钙硅对设施春茬番茄根系生长、NPK吸收及产量和水分利用的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2021, 39(1): 143–147.
Li Y M, Liao S Q, Zhang L, *et al.* Effects of calcium and silicon on

- root growth, NPK uptake, yield and water use of tomato in spring[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2021, 39(1): 143–147.
- [19] Wang Y, Xie X B, Long L. The effect of postharvest calcium application in hydro-cooling water on tissue calcium content, biochemical changes, and quality attributes of sweet cherry fruit[J]. *Food Chemistry*, 2014, 160: 22–30.
- [20] Ma M Z, Liu Y F, Bai C M, Yong J W H. The significance of chloroplast NAD (P) H dehydrogenase complex and its dependent cyclic electron transport in photosynthesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: e661863.
- [21] 薛应龙. 植物生理实验指导[M]. 上海: 化学出版社, 1985.
- Xue Y L. Plant physiological experiment guide[M]. Shanghai, China: Chemical Press, 1985.
- [22] Jana S, Choudhuri M A. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging[J]. *Aquatic Botany*, 1981, 12: 345–354.
- [23] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, (6): 55–57.
- Wang A G, Luo G H. Quantitative relationship between hydroxylamine reaction and superoxide free radicals in plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1990, (6): 55–57.
- [24] 周晓阳, 依艳丽, 徐龙超. 钙氮营养平衡对番茄叶霉病抗性的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2013, (5): 56–61.
- Zhou X Y, Yi Y L, Xu L C. Effects of nutrient balance of calcium and nitrogen on resistance to tomato leaf mildew[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2013, (5): 56–61.
- [25] 郑秋玲, 谭伟, 马宁, 等. 钙对高温下巨峰葡萄叶片光合作用和叶绿素荧光的影响[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(9): 1963–1968.
- Zheng Q L, Tan W, Ma N, *et al.* Effects of calcium on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in grape leaves under high temperature[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(9): 1963–1968.
- [26] 陈向明, 郑国生, 张圣旺. 钙对保护地栽培牡丹光合特性的影响[J]. *园艺学报*, 2001, 28(6): 572–57.
- Chen X M, Zheng G S, Zhang S W. Effects of calcium on photosynthetic characteristics of peony cultivated in protected land[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(6): 572–57.
- [27] 艾希珍, 王秀峰, 崔志峰. 钙对弱光亚适温下黄瓜光合作用的影响[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(9): 1865–1871.
- Ai X Z, Wang X F, Cui Z F. Effects of calcium on photosynthesis of cucumber under low light and sub-optimum temperature[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(9): 1865–1871.
- [28] Joham H E. Carbohydrate distribution as affected by calcium deficiency in cotton[J]. *Plant Physiology*, 1957, 32: 113–117.
- [29] Eckardt N A. A calcium-regulated gatekeeper in phloem sieve tubes[J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 989–992.
- [30] Sonoike K. Photoinhibition of photosystem I[J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 142: 56–64.
- [31] Albert P, Roberto B. Molecular mechanisms involved in plant photoprotection[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(2): 467–482.
- [32] Li Z Y, Li W, Bing X, *et al.* Effects of exogenous calcium and calcium chelant on cold tolerance of postharvest loquat fruit[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 269: 109391.
- [33] Hurry V M, Keerberg O, Parnik T, *et al.* Cold hardening results in increased activity of enzymes involved in carbon metabolism in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.)[J]. *Planta*, 1994, 195: 554–562.
- [34] Guy C L, Huber J L A, Huber S C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature[J]. *Plant Physiology*, 1992, 100: 502–508.
- [35] Zhou R, Quebedeaux B. Changes in photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature apple leaves in response to whole plant source-sink manipulation[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, 128: 113–119.
- [36] 何洁, 刘鸿先, 王以柔, 等. 低温与植物的光合作用[J]. 植物生理学通讯, 1986, (2): 1–6.
- He J, Liu H X, Wang Y R, *et al.* Low temperature and photosynthesis in plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1986, (2): 1–6.
- [37] 王冰, 程宪国. 干旱、高盐及低温胁迫下植物生理及转录因子的应答调控[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 33(6): 1565–1574.
- Wang B, Cheng X G. Physiological responses and regulatory pathways of transcription factors in plants under drought, high-salt, and low temperature stresses[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 33(6): 1565–1574.
- [38] Lu Y Q, Liu H P, Wang Y, *et al.* Synergistic roles of leaf boron and calcium during the growing season in affecting sugar and starch accumulation in ripening apple fruit[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35: 2483–2492.
- [39] Stitt M, Lilley R M C, Gerhardt R, *et al.* Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves[J]. *Methods Enzymology*, 1989, 174: 518–552.
- [40] Paul M J, Lawlor D W, Driscoll S P. The effect of temperature on photosynthesis and carbon fluxes in sunflower and rape[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1990, 41: 547–555.
- [41] Paul M J, Driscoll S P, Lawlor D W. The effect of cooling on photosynthesis, amounts of carbohydrate and assimilate export in sunflower[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1991, 42: 845–852.
- [42] Wang L J, Li T L. Effects of low temperature treatment at night on sucrose synthesis ability of tomato leaves[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(5): 707–709.
- [43] Gulen H, Cansev A, Eris A. Cold hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: Seasonal alteration of soluble sugars and phospholipids[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 2009, 147(4): 459–467.
- [44] Hu M, Shi Z, Zhang Z, *et al.* Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seed-lings under salt stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, 68(2): 177–188.
- [45] Choudhury F K, Rivero R M, Blumwald E, *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination[J]. *Plant Journal*, 2017, 90: 856–867.
- [46] Neuser J, Metzen C C, Dreyer B H, *et al.* HBI1 mediates the trade-off between growth and immunity through its impact on apoplastic ROS homeostasis[J]. *Cell Reports*, 2019, 28: 1670–1678.

- [47] 罗娅, 汤浩茹, 张勇. 低温胁迫对草莓叶片SOD和AsA-GSH循环酶系统的影响[J]. *园艺学报*, 2007, 34(6): 1405–1410.
- Luo Y, Tang H R, Zhang Y. Effects of low temperature stress on SOD and ASA-GSH circulatory enzyme system in strawberry leaves[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(6): 1405–1410.
- [48] Gilroy S, Suzuki N, Miller G, *et al.* A tidal wave of signals: Calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19: 623–630.
- [49] Dongsansuk A, Lütz C, Neuner G. Effects of temperature and irradiance on quantum yield of PSII photochemistry and xanthophyll cycle in a tropical and a temperate species[J]. *Photosynthetica*, 2013, 51: 13–21.
- [50] Takahashi S, Murata N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition?[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13: 178–182.
- [51] Shi Q W, Pang J Y, Yong J W H, *et al.* Phosphorus-fertilisation has differential effects on leaf growth and photosynthetic capacity of *Arachis hypogaea* L.[J]. *Plant and Soil*, 2020, 447: 99–116.
- [52] Monroy A F, Sarhanf, Dhinds R S. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression (evidence for a role of calcium)[J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(4): 1227–1235.
- [53] Roux D, Vian A, Girard S, *et al.* High frequency (900 MHz) low amplitude (5 Vm^{-1}) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato[J]. *Planta*, 2008, 227(4): 883–891.