

外源水杨酸对低温下杏花抗氧化酶和CBF转录因子表达的影响

张俊环, 王玉柱*, 孙浩元, 杨丽, 姜凤超

北京市农林科学院林业果树研究所, 北京100093

摘要: 为探讨水杨酸(SA)对杏花抗寒性的影响机制, 以早熟品种‘骆驼黄’杏的显蕾期花枝为试材, 分析-2 ℃的低温下适宜浓度SA及其抑制剂ABT和PAC对杏花MDA、抗氧化酶和CBF转录因子的影响。结果表明, -2 ℃低温条件下, 对照和2个SA抑制剂处理的杏花细胞膜系统均受到严重伤害, CAT、POD和SOD等抗氧化酶活性降低, MDA含量明显升高。而SA预处理的杏花在低温胁迫期间抗氧化酶活性增强, MDA含量比对照和抑制剂处理的有明显降低且相对稳定。通过荧光定量检测CBF转录因子的表达水平, 表明SA能诱导杏花CBF基因的表达, 尤其在低温处理3 h时, SA预处理的杏花中CBF的表达量明显高于对照和SA抑制剂处理。由此认为, 适宜浓度的外源SA可能是通过调控低温下杏花中CBF转录因子的表达、增强细胞的抗氧化酶活性, 减轻低温造成的膜脂过氧化伤害, 从而在一定程度上增强了杏花的抗寒性。

关键词: 杏花; 抗氧化酶; CBF; 低温; 水杨酸

Effects of Exogenous Salicylic Acid on Antioxidant Enzymes and CBF Transcription Factor in Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Flowers under Chilling Stress

ZHANG Jun-Huan, WANG Yu-Zhu*, SUN Hao-Yuan, YANG Li, JIANG Feng-Chao

Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China

Abstract: In order to explore the mechanism of exogenous salicylic acid (SA) induced chilling resistance of apricot flowers, the twigs with flower-buds of apricot plant (*Prunus armeniaca* L. cv. ‘Luotuo Huang’) were selected as experimental materials. The levels of MDA, antioxidant enzymes and the expression of *CBF* gene were investigated in apricot flowers during -2 ℃ chilling stress with pretreated with H₂O, 0.1 mmol·L⁻¹ SA and SA inhibitors (ABT and PAC), respectively. The results showed that pretreatments with H₂O, ABT and PAC decreased the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), and increased the MDA content during chilling stress. In contrast, 0.1 mmol·L⁻¹ SA pretreatment enabled apricot flowers to maintain higher activities of these three enzymes and a lower level of MDA to weaken oxidative injury induced by chilling temperature. The real-time RT-PCR analysis indicated that the expression of *CBF* gene could be induced by SA and the level of *CBF* was much higher than that in pretreatments with H₂O, ABT and PAC, especially under chilling stress for 3 h. However, the *CBF* expression induced by SA was weakened with the chilling time prolonging. Taken together, it was considered that the suitable exogenous SA (0.1 mmol·L⁻¹) enhanced chilling tolerance in apricot flower maybe through induction of CBF transcription factor and activations of antioxidative capacity, such as, POD, POD and CAT.

Key words: apricot (*Prunus armeniaca*) flower; antioxidant enzymes; CBF; chilling; salicylic acid

杏树作为公认的抗旱“先锋”树种, 在农村经济发展及生态环境建设中的地位日益重要, 尤其在华北、西北、东北等北方地区被广泛种植。在北方果树栽培中, 杏树几乎是春季开花最早的果树, 而杏花期正值早春气温急剧变化时期, 此时抗寒力较低的花朵, 尤其是雄蕊和雌蕊, 常常遭受“倒春寒”危害而造成杏园大幅度的减产或绝收, 给生产带来巨大损失(王飞1999; 彭伟秀等2002; 孟庆瑞

等2008)。许多研究表明, 水杨酸(salicylic acid, SA)是重要的能够激活植物过敏反应和系统获得性抗性的内源信号分子。除了参与植物抵抗病害等生物胁迫外, 外施SA还可提高植物对高温、干旱、

收稿 2013-09-16 修定 2014-01-08

资助 北京市新星计划(2009B27)和北京市自然科学基金(6122011)。

* 通讯作者(E-mail: chinabjwyz@sohu.com; Tel: 010-82592521)。

盐渍以及重金属离子等多种非生物胁迫的抵抗能力。在抗寒性方面,适当浓度的外源SA能提高小麦、烟草、西瓜和枇杷等多种植物幼苗或幼果的抗寒性(Taşgin等2006; Yang等2008; 刘国强等2009; 邓世媛等2012)。另外,植物低温驯化过程中的关键性调控因子CBF (C-repeat binding factor)在植物的抗逆性研究中也日益受到关注,广泛参与植物的抗冷性调节(Takuhara等2011; Wisniewski等2011; Zhou等2012)。并有研究表明,拟南芥CBF1转录因子在转基因烟草中受低浓度SA诱导表达,且不影响烟草的生长发育(崔百明等2007)。可见,SA和CBF均与植物的抗寒性密切相关,但目前还鲜见关于SA诱导杏花抗冷性及其诱导机制的报道。因此,本文通过对杏花进行适宜浓度的SA溶液及其抑制剂处理,分析低温条件下杏花中膜保护酶活性和CBF转录因子的表达变化,从而探讨SA诱导杏花抗寒性的机制,为SA在减轻果树晚霜危害的应用中提供理论依据。

材料与amp;方法

1 材料与处理

1.1 材料

选择早熟品种‘骆驼黄’杏(*Prunus armeniaca* L. cv. ‘Luotuo Huang’) 5~8年生大树,在显蕾期剪取35~45 cm长(有25~30朵花蕾)的一年生花枝,带回实验室进行试验处理。

1.2 外源SA浓度的筛选试验处理

将花枝放入盛有0.01、0.1、0.5、1.0和10.0 mmol·L⁻¹的SA水溶液的烧杯中进行溶液培养加喷施(内含0.3%的Tween 20)处理,以清水处理为对照,在常温(20~22 °C)下吸收2 h,之后转入(-2±0.5) °C,进行3 h的低温处理。

1.3 适宜浓度外源SA及其抑制剂处理。

将花枝放入盛有SA (0.1 mmol·L⁻¹, 试验确定的使用适宜浓度)及其抑制剂0.1 mmol·L⁻¹多效唑(paclobutrazol, PAC)、0.1 mmol·L⁻¹ 1-氨基苯并三唑(1-aminobenzotriazole, ABT)溶液的烧杯中进行溶液培养加喷施(内含0.3%的Tween 20)处理,以清水处理为对照,在常温(20~22 °C),下吸收2 h。之后转入(-2±0.5) °C进行0、3和6 h的低温处理。

每个处理设3次重复,每次重复采用10~15个

花枝。处理之后摘取花朵,用液氮速冻后置-80 °C下保存,用于生理指标测定和基因表达分析。

2 指标测定

2.1 丙二醛(MDA)含量测定

参照Dhindsa等(1981)的TBA比色法,最后采用公式 $C=6.45(D_{532}-D_{600})-0.56D_{450}$ 来计算MDA含量,结果以nmol·g⁻¹(FW)表示。

2.2 膜保护酶CAT、POD和SOD的提取与活性测定

取0.5 g材料加入5 mL提取缓冲液[50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液、1% (W/V) PVPP、5 mmol·L⁻¹ DTT和1% (V/V) PMSF],液氮研磨,匀浆以12 000×g、4 °C下离心10 min,上清液为酶提取液。

SOD测定参照Dhindsa等(1981)的方法,以抑制NBT光化学还原50%为1个酶活力单位,结果以U·mg⁻¹(蛋白)计算。POD活性测定参照Kalir等(1984)的愈创木酚法,以 ΔOD_{470} 变化0.01为1个酶活力单位,结果以U·mg⁻¹(蛋白)·min⁻¹计算。CAT活性测定参照Zhang等(2005)的方法,以1 min内OD₂₄₀减少0.1为1个酶活力单位,结果以U·mg⁻¹(蛋白)计算。

2.3 CBF荧光定量PCR

2.3.1 引物设计与合成

依据荧光实时定量PCR引物设计原则,根据近缘物种梅子CBF/DREB基因的保守序列(GenBank登录号HM099910.1),用Primer 5.0设计引物。CBF基因上游引物: 5' GGAGTAGGGAC-AACAACAAGTG 3'; 下游引物: 5' TCTCAG-CCGTAGGATAGGTC 3'。用这对引物在‘骆驼黄’杏上只扩增出一个CBF基因。选择同源的中国樱桃Actin为内参基因研究杏花中CBF的表达。Actin基因上游引物: 5' CAATGTGCTGCCATGTATG 3'; 下游引物: 5' CCAGCAGCTTCCATTCCAAT 3' (Huang等2008)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2.3.2 杏花RNA的提取和荧光定量PCR扩增分析

采用Trizol试剂盒,提取杏花的总RNA,并对总RNA进行1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,利用NanoDrop分光光度计进行浓度和纯度的测定。

参考Miura等(2007)的方法,根据BioTeke公司生产的2×SYBR Real-Time PCR Premixture PR7002说明书进行。反应在BIO-RAD iCycler Thermal

Cycler 96-Well Thermal Sealing Ring PCR仪上进行, 采用三步法, 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 62 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 45 个循环; 循环后设置 75.0~99 °C 每隔 0.5 °C 时读取荧光值生成融解曲线。根据标准曲线所得的线性计算公式, 将样品的临界循环值 C_t 代入公式, 得到其相对浓度。同一模板中目的基因和对照基因的相对浓度的比值即为目的基因相对表达水平。样本和内参分别设 3 个重复。

实验结果

1 外源SA浓度的筛选

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化作用的最终产物, 是膜系统受害的重要标志之一。由图1可见, 低温处理 3 h 时, 膜系统受到了不同程度的伤害, 不同浓度 SA 处理的杏花 MDA 含量变化不同, 0.01、0.1 和 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 预处理的杏花中 MDA 含量都低于清水对照处理, 而较高浓度(1.0 和 10.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) SA 预处理的杏花 MDA 含量高于对照处理。这表明, 低于 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SA 溶液预处理杏花枝, 可增强花器的低温抗性, 而高于 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SA 溶液处理不但不能增强低温抗性, 反而会加剧杏花的低温伤害。另外, 在低浓度范围内, 相对较低和较高浓度的预处理对杏花低温抗性的影响都不明显, 而 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 溶液预处理可明显降低低温胁迫

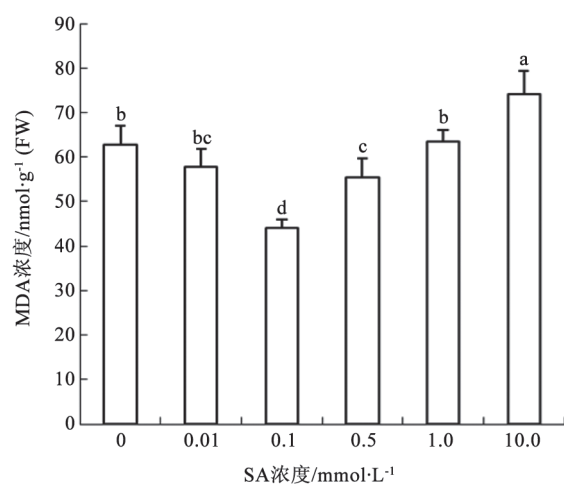


图1 不同浓度SA预处理对低温胁迫后杏花MDA含量的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of SA pretreatment on the level of MDA in apricot flowers after chilling treatment
不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下图同此。

下杏花的MDA含量, 因此认为, 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是最适的外源SA施用浓度。本文中以后的SA处理实验均是采用 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液。

2 低温胁迫下外施SA及其抑制剂对杏花MDA含量和保护酶活性的影响

图2表明, 在常温下, 喷施SA及其抑制剂对杏花细胞内的MDA含量没有明显影响, 各处理间没有显著差异。而低温处理 3 h 后, 各处理杏花细胞内的MDA含量都有所升高, 并随低温时间延长略有增加, 这表明细胞受到了不同程度的低温伤害, 并随低温处理时间延长而略有加重。在 2 个低温处理时间段, 喷施SA的杏花MDA含量都明显低于其他 3 个处理, 这表明外施SA可以明显延缓低温引起的膜脂过氧化作用, 从而减轻膜系统损伤。

CAT、SOD和POD是植物体内抵御活性氧伤害的重要的抗氧化酶类。结果(图3)显示, 进入低温胁迫处理前, 4 个处理的杏花细胞中的 3 种抗氧化酶的活性水平都没有明显的差异。而进入低温期间, SA 预处理的杏花在低温处理 3 h 时 SOD 活性大幅增加, 随着低温胁迫时间的延长, 酶活性有所下降, 胁迫 6 h 下降为 165.2 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)。但仍高于低温前的活性值 108.1 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)。喷水的对照处理和 2 种抑制剂处理的杏花细胞中的 SOD 活性却呈现出与 SA 预处理后明显不同的变化趋势, 这 3 种处理的 SOD 活性随低温时间的延长而逐渐下降,

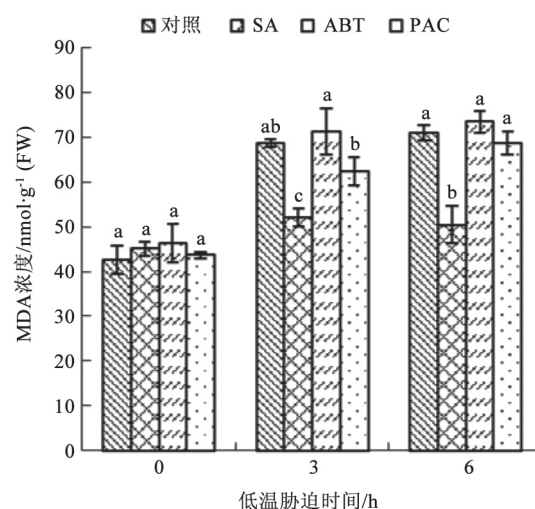


图2 低温胁迫下不同处理对杏花MDA含量的影响
Fig.2 Effects of H₂O, SA, ABT and PAC pretreatment on the level of MDA in apricot flowers during chilling treatment

ABT处理的SOD活性最低,并且在各个低温时期的活性都显著低于SA处理。

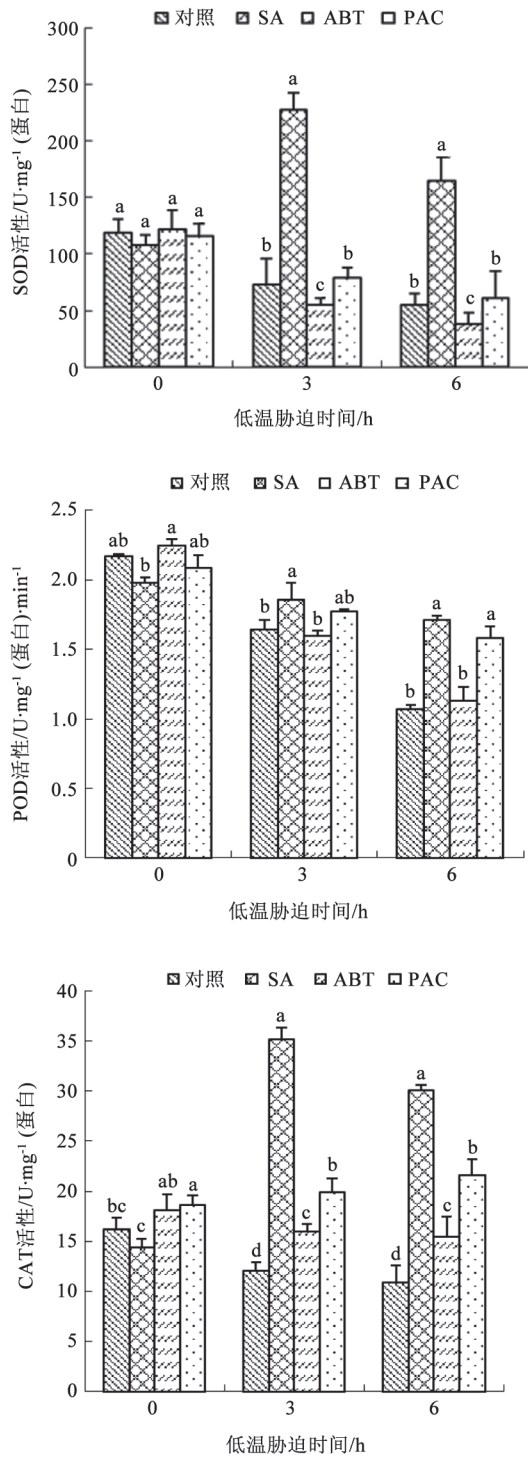


图3 低温胁迫下不同处理对杏花内SOD、POD和CAT活性的影响

Fig.3 Effects of H₂O, SA, ABT and PAC pretreatment on activities of SOD, POD and CAT in apricot flowers during chilling treatment

低温期间,随着时间的延长,4种处理的POD活性都有不同程度的下降。SA处理的POD活性显著高于对照和ABT处理的,与PAC处理的差异不显著。

CAT活性的变化与SOD和POD有所不同,在低温处理3 h时,除对照和ABT处理外,SA或PAC预处理的CAT活性都有不同程度的增加,SA处理的活性增加最多,明显高于其他处理。随着低温处理时间延长至6 h,对照与SA处理的CAT活性有所下降,对照处理迅速下降至10.93 U·mg⁻¹ (蛋白),明显低于低温前的16.15 U·mg⁻¹ (蛋白)。而2种抑制剂处理的CAT活性相对稳定,受低温影响较小,但活性值仍然低于SA处理的。

以上结果表明,SA预处理可维持或增强杏花在低温条件下的抗氧化酶活性,降低细胞膜脂过氧化,从而增强杏花的抗寒性。

3 低温胁迫下外施SA对杏花CBF表达的影响

由图4可见,在常温条件下,各处理对杏花中CBF基因的表达量均有影响,SA预处理显著诱导杏花中CBF的表达,而抑制剂ABT和PAC则抑制基因表达。转入低温胁迫后,所有处理中CBF的表达量都明显增加,但随着低温时间的延长,对照和PAC处理的CBF基因的表达量继续呈增加趋势,而SA和ABT处理在低温6 h时的CBF表达量有所回落,但仍高于低温处理前的表达水平。在整个处理期间,SA预处理的杏花CBF表达量都一直高于其他3个处理。由此认为,杏花中CBF基因可能存在组成型表达和诱导型表达两种类型,SA可诱导CBF的表达,并且与低温相结合能加强其诱导表达。

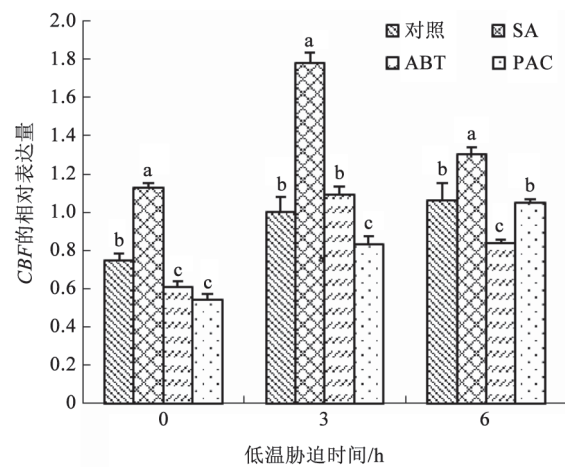


图4 低温胁迫下不同处理对杏花内CBF表达水平的影响
Fig.4 Effects of H₂O, SA, ABT and PAC pretreatment on the level of CBF in apricot flowers during chilling treatment

讨 论

1 外源SA可增强杏花的抗寒性

诸多研究表明, 外源SA可以增强多种植物的抗寒性。但SA的作用因使用浓度不同导致其作用效果也不同。Yang等(2008)研究表明, 适宜浓度SA可增强西瓜的耐冷性; 而高浓度则降低抗氧化酶活性, 削弱西瓜的耐冷能力。耿广东等(2002)认为, 在低温条件下, SA浓度越大, 其对提高茄子抗寒性的作用越强。另外, 低浓度SA与高浓度SA对鸭梨离体花序的作用也是不一样的。低浓度($0.002 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) SA可以抑制膜脂过氧化, 从而延缓花的衰老, 而 $0.02\sim 0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA可以促进膜脂过氧化, 加速梨花衰老(田志喜等2001)。

不同作物所对应的SA适宜浓度也不同。 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA是增强西瓜幼苗和烤烟耐冷性的适宜浓度(Yang等2008; 邓世媛等2012)。 $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (约 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) SA是增强枇杷幼果抗寒性的最适浓度(刘国强等2009)。番茄以 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (约 $2.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) SA处理的效果最佳(李艳军等2006)。郭守华等(2004)认为, 在桃树初花期喷施 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (约 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的SA可强化某些抗性指标, 降低花期 0°C 的低温伤害。本文结果表明, 在低温条件下, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理的杏花枝, 其花朵中的MDA含量最低, 是提高杏花耐冷性的适宜浓度(图1)。另外, 高浓度SA不仅起不到抗寒性效果(图1), 还会抑制花蕾的发育进程(结果未列出)。

2 外源SA可提高低温条件下杏花的抗氧化酶活性

已有的外源SA对SOD和POD影响的研究结果基本一致, 即施用适宜浓度的SA可增强植物的SOD和POD活性(Chan和Tian 2006; Yang等2008)。本文与此相一致, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理的杏花中SOD和POD活性在低温下明显高于清水对照和抑制剂PAC与ABT处理(图3), 使MDA含量降低(图2), 减轻了 -2°C 低温引发的膜脂过氧化作用, 从而减轻了杏花的低温伤害。

而SA对CAT影响的研究结果存在分歧, 有研究认为SA能抑制CAT活性, 并增强植物的抗逆性(Chan和Tian 2006; Shi和Zhu 2008)。在低温条件下, 外源SA可以增强PPO活性, 降低CAT和POX活性, 实现增强冬小麦的耐冷性(Taşgım等2006)。而有的研究表明, SA是通过增强CAT的活性来

提高植物的低温耐性(邓世媛等2012)。

SA作为信号分子能够激发植物的防御反应。但也有研究表明, 环境胁迫会引起内源SA的产生, 如果内源SA浓度过高便会引起氧化伤害(Sawada等2006)。SA缺失突变体nahG能增强抵御非生物胁迫的能力。并有研究认为, CAT是SA的受体, SA与CAT结合而导致CAT活性降低(Chen等1993; Ruffer等1995)。ABT是内源SA生物合成途径中的关键酶benzoic 2-hydroxylase (BA2H)的抑制剂, 通过抑制BA2H来控制SA的积累, 可以减轻盐胁迫和高温引起的氧化伤害(Sawada等2006; Pan等2006)。而PAC是SA生物合成的另一个抑制剂, 仅抑制结合态SA (SAG)的生物合成, 但不能抑制自由态SA的高温诱导性剧增(Liu等2006)。本试验中, 与清水对照处理相比, 外源SA处理在常温下对CAT活性有一定的抑制作用, 而ABT和PAC两种抑制剂处理的杏花CAT活性则高于对照(图3), 由此推测可能是常温下, SA预处理后, 杏花吸收的SA可以与植物体内的CAT相结合从而降低其活性。而低温胁迫引起的 H_2O_2 和内源SA等信号分子物质可以激发植物自身的防御系统, 从而使CAT等抗氧化酶活性增强。随着低温时间的延长, 内源SA的含量增加, 对照和外源SA处理的CAT活性都有不同程度的降低, 而抑制剂处理的杏花中CAT活性却呈上升趋势, 可能是低温胁迫诱导下, 对照与外施SA处理的杏花细胞中内源SA浓度积累到了较高水平, 与CAT结合而影响了CAT活性, 而抑制剂处理则减弱了这一影响。在整个低温处理期间, 外源SA预处理的杏花CAT活性都明显高于抑制剂处理和对照处理。

3 外源SA可增强低温下杏花中CBF转录因子的表达水平

CBF是植物所特有的转录因子, 由逆境胁迫诱导产生后, 可激活其他一系列依赖DRE/CRT顺式作元件的抗逆功能基因的表达, 从而增强植物对干旱、低温及高盐等逆境的抗性(Agarwal等2006; Medina等2011)。在拟南芥中, 过量表达CBF1和CBF3均可显著提高拟南芥的抗冻能力。葡萄中VvCBF2、VvCBF4、VvCBFL和VvZFPL 4个基因的超表达均能增强葡萄的耐冷性(Takuhara等2011)。小麦WCBF2基因转入烟草中, 可诱导烟草Cor/Lea

基因的表达, 增强其抗冻性(Takumi等2008)。转拟南芥*CBF3*基因的烟草对低温具有更好的适应能力(刘荣梅等2010)。来源于拟南芥的*CBF1*基因导入草莓中可以提高草莓对低温胁迫的抵抗力(金万梅等2007)。苹果中转入桃的*CBF*转录因子可导致短日照诱导休眠, 增强抗冷性(Wisniewski等2011)。可见, *CBF*的表达与植物抗冷性密切相关。*CBF*的诱导表达能在一定程度上减轻低温伤害, 但并不能完全避免低温对杏花的伤害, 所以, 低温处理6 h时, 对照和PAC处理中*CBF*的表达量虽比3 h时略有增加, 但仍没能阻止低温带来的氧化伤害和MDA含量的增加(图2和4)。

通常情况下, *CBF*只有在低温或其它逆境条件下才能诱导表达, 即诱导型表达。番茄果实中*LeCBF1*在非低温条件下不表达, 且在低温下的表达受外源乙烯和1-MCP (乙烯的竞争性抑制剂)的调控(Zhao等2009)。葡萄中*VvCBF2*、*VvCBF4*、*VvCBFL*、*VvZFPL* 4个基因在不同组织中的表达形式不同, 在叶片中4个基因均是低温诱导表达, 而在卷须中全是组成型表达, 在花中仅*VvZFPL*是组成型表达(Takuhara等2011)。另外, 在常温下SA处理可调控荠菜*CbCBF*的表达及*CBF*途径中抗冷相关基因*CbICE53*、*CbCOR15a*、*CbCOR15b*、*CbCAX51*和*CbRCl35*的表达。SA对荠菜*CbCBF*的表达是短暂的诱导作用, 相对于未处理之前, 其表达量在处理1 h时上调非常明显, 之后逐渐下调(周明琦2010)。本试验结果也表明SA有诱导*CBF*表达的作用, 同时也表明*CBF*的表达受低温诱导。随着低温时间的延长, 对照和PAC处理的*CBF*基因的表达量继续呈增加趋势, 而SA和ABT处理在低温6 h时的*CBF*表达量有所回落(图4)。低温对*CBF*的诱导表达可能有一个时间相关性。*LeCBF1*在2℃低温处理2和16 h的番茄果实中有2个高峰(Zhao等2009)。Miura和Ohta (2010)在拟南芥上的研究结果表明, *DREB1A/CBF3*在常温下几乎不表达, 在低温3 h达到一峰值, 随着低温时间的延长, *DREB1A/CBF3*表达量逐渐减少; 至24 h时, 降低至接近常温时的水平。茶树*CBF*基因在低温诱导4 h开始表达, 在8 h左右表达量最高, 然后开始下降, 但仍维持在一个较高的水平(陈暄等2009)。本研究结果与后者相似。

参考文献

- 陈暄, 房婉萍, 邹中伟, 王玉花, 成浩, 黎星辉(2009). 茶树冷胁迫诱导抗寒基因*CBF*的克隆与表达分析. 茶叶科学, 29 (1): 53~59
- 崔百明, 任艳利, 乐锦华, 彭明, 周鹏(2007). 水杨酸诱导表达*AtCBF1*的转基因烟草研究. 西北农业学报, 16 (6): 90~93
- 邓世媛, 陈建军, 罗福命, 王维, 凌寿军, 王俊(2012). 外源水杨酸对低温胁迫下烤烟抗氧化代谢的影响. 烟草科技, (2): 71~74
- 耿广东, 程智慧, 李建设, 张素勤(2002). 水杨酸对茄子幼苗抗寒性的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 30 (6): 101~103
- 郭守华, 杨晴, 杨晓玲, 张曼(2004). 水杨酸对桃树花期抗寒性的影响. 园艺学报, 31 (5): 675
- 金万梅, 董静, 尹淑萍, 闫爱玲, 陈梅香(2007). 冷诱导转录因子*CBF1*转化草莓及其抗寒性鉴定. 西北植物学报, 27 (2): 223~227
- 李艳军, 王丽丽, 蒋欣梅, 于锡宏(2006). 外源水杨酸诱导对番茄幼苗抗冷性的影响. 东北农业大学学报, 37 (4): 463~467
- 刘国强, 吴锦程, 朱颖, 刘美琼, 蔡小玲, 陈丽平(2009). 水杨酸对低温胁迫下枇杷幼果若干生理生化指标的影响. 热带作物学报, 30 (3): 254~258
- 刘荣梅, 胡国富, 魏琪, 王文重, 李凤兰, 胡宝忠(2010). 低温对转*CBF3*基因烟草叶绿体超微结构和生理特性的影响. 安徽农业科学, 38 (18): 9501~9503
- 孟庆瑞, 王文凤, 梁隐泉, 聂庆娟, 李彦慧, 杜绍华, 杨建民(2008). 杏品种花器官过冷却点及结冰点的研究. 中国农业科学, 41 (4): 1128~1133
- 彭伟秀, 杨建民, 张芹, 王保柱, 马黎明, 邓有红, 吴颖鑫(2002). 杏花器官组织抗寒性研究. 果树学报, 19 (2): 108~110
- 田志喜, 张玉星, 于艳, 高慧敏(2001). 水杨酸对离体鸭梨花序衰老的影响. 果树学报, 18 (6): 372~373
- 王飞, 陈登文, 李嘉瑞, 何伟(1995). 杏花及幼果的抗寒性研究. 西北植物学报, 15 (2): 133~137
- 周明琦, 吴丽华, 沈忱, 林娟(2010). ABA、MeJA和SA诱导下的荠菜*CBF*途径冷响应相关基因表达调控研究. 中国农业科技导报, 12 (6): 75~80
- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Rep, 25 (12): 1263~1274
- Chan Z, Tian S (2006). Induction of H₂O₂-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. Postharvest Biol Tech, 39: 314~320
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science, 262: 1883~1886
- Dhindsa RS, Dhindsa PP, Thrope TA (1981). Leaf senescence; correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J Exp Bot, 3: 93~101
- Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD (2006). Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP2-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. J Exp Bot, 57 (12): 3337~3347
- Huang SX, Wu HQ, Li YR, Wu J, Zhang SJ, Heng W, Zhang SL (2008). Competitive interaction between two functional *S*-haplotypes confer self-compatibility on tetraploid Chinese cherry (*Prunus*

- pseudocerasus* Lindl. cv. Nanjing Chuisi). Plant Cell Rep, 27: 1075~1085
- Kalir A, Ornri G, Poljakoff-Mayber A (1984). Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. Physiol Plant, 62: 238~244
- Medina J, Catalá R, Salinas J (2011). The CBFs: three arabidopsis transcription factors to cold acclimate. Plant Sci, 180: 3~11
- Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 19: 1403~1414
- Miura K, Ohta M (2010). SIZ1, a small ubiquitin-related modifier ligase, controls cold signaling through regulation of salicylic acid accumulation. J Plant Physiol, 167: 555~560
- Pan Q, Zhan J, Liu H, Zhang J, Chen J, Wen P, Huang W (2006). Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. Plant Sci, 171: 226~233
- Ruffer M, Steipe B, Zenk MH (1995). Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. FEBS Lett, 377: 175~180
- Sawada H, Shim IS, Usui K (2006). Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis - Modulation by salt stress in rice seedlings. Plant Sci, 171: 263~270
- Shi Q, Zhu Z (2008). Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Environ Exp Bot, 63: 317~326
- Takuhara Y, Kobayashi M, Suzuki S (2011). Low-temperature-induced transcription factors in grapevine enhance cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. J Plant Physiol, 168: 967~975
- Takumi S, Shimamura C, Kobayashi F (2008). Increased freezing tolerance through up-regulation of downstream genes via the wheat *CBF* gene in transgenic tobacco. Plant Physiol Biochem, 46: 205~211
- Taşgın E, Atıcı Ö, Nalbantoğlu B, Popova LP (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Phytochemistry, 67: 710~715
- Wisniewski M, Norelli J, Bassett C, Artlip T, Macarasin D (2011). Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) *CBF* transcription factor in apple (*Malus domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. Planta, 233: 971~983
- Yang JH, Gao Y, Li YM, Qi XH, Zhang MF (2008). Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon. Sci Hort, 118: 200~205
- Zhang JH, Huang WD, Liu YP, Pan QH (2005). Effect of temperature-acclimation pretreatment on ultrastructure of mesophyll cell in young grape plants under cross temperature-stresses. J Integ Plant Biol, 47(8): 959~970
- Zhao D, Shen L, Fan B, Yu M, Zheng Y, Lv S, Sheng J (2009). Ethylene and cold participate in the regulation of *LeCBF1* gene expression in postharvest tomato fruits. FEBS Lett, 583: 3329~3334
- Zhou M, Wu L, Liang J, Shen C, Lin J (2012). Expression analysis and functional characterization of a novel cold-responsive gene *CbCOR15a* from *Capsella bursapastoris*. Mol Biol Rep, 39: 5169~5179