

钙调素拮抗剂与 Ca^{2+} 对茄子幼苗抗冷性的影响

高洪波 陈贵林*

(河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要: 研究钙调素 (CaM) 拮抗剂 W7 [N- (6-aminohexyl) -5-chloro-1-naphthalene sulfonamide] 和 Ca^{2+} 对茄子幼苗抗冷性的影响, 结果表明: W7 浸种处理显著提高了低温胁迫下茄子幼苗叶片电解质渗透率和 MDA 含量, 降低了 SOD、CAT 活性和可溶性蛋白质含量; 而 Ca^{2+} 浸种处理显著降低了低温胁迫下叶片电解质渗透率和 MDA 含量, 提高了 SOD、CAT 活性和可溶性蛋白质含量, 说明 Ca^{2+} ·CaM 信使系统在茄子幼苗抗冷调控过程中起着重要的作用。

关键词: 钙调素; CaM 拮抗剂; Ca^{2+} ; 茄子; 抗冷性

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 03-0243-04

茄子属典型的喜温蔬菜, 低温冷害是制约茄子越冬栽培的主要障碍因子。研究表明, 第二信使 Ca^{2+} 在调节植物细胞对低温^[1,2]、高温^[3,4]、盐害^[5]等环境胁迫信号转导过程中起着重要的作用。CaM 作为 Ca^{2+} 的受体, 通过与 Ca^{2+} 结合而激活一系列的靶酶和非酶蛋白, 从而调控生理代谢及基因表达^[6]。W7 [N- (6-aminohexyl) -5-chloro-1-naphthalene sulfonamide] 作为一种新的 CaM 拮抗剂, 可导致 Ca^{2+} ·CaM 信使系统功能发生障碍, 与 CPZ (氯丙嗪)、TFP (三氟拉嗪) 等其它 CaM 拮抗剂相比, W7 不影响细胞膜的结构和流动性^[7,14]。因此利用 W7 和 Ca^{2+} 处理阻碍和增强 Ca^{2+} ·CaM 信使系统是目前探索活体植物 Ca^{2+} ·CaM 信使功能的重要手段。目前国内外对 Ca^{2+} 和 CaM 的研究多是以玉米、水稻等农作物为材料, 尚未见有关 Ca^{2+} 和 CaM 拮抗剂与茄子抗冷性的研究报道。

本试验利用 W7 和 Ca^{2+} 浸种处理研究 Ca^{2+} ·CaM 对低温胁迫下茄子幼苗膜脂过氧化、保护酶活性及保护性物质含量等方面的影响, 从阻碍和增强 Ca^{2+} ·CaM 信使系统转导两个角度揭示 Ca^{2+} ·CaM 信使在抗冷中的作用机理, 为茄子乃至蔬菜设施栽培防止低温冷害提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2000 年 2~4 月和 2001 年 2~4 月分两期在河北农业大学进行。茄子 (*Solanum melongena* L.) 品种为丰研 2 号 (Fengyan 2)。种子经 0.1% KMnO_4 消毒后, 分成 3 份。分别设 40 mmol L^{-1} CaCl_2 (分析纯)、300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ W7 (Sigma 公司产品) 和去离子水 (对照) 浸种 3 个处理。浸种 12 h 后将种子排列于铺有滤纸的培养皿中, 28℃ 催芽 72 h。将发芽整齐的种子分别播于装有蛭石的 72 孔穴盘中, 在日光温室内培育幼苗。昼温 25~28℃, 夜温 15~17℃, 其它管理与一般日光温室相同。子叶展平后每隔 2 d 用 1/2 营养液 (按日本山崎茄子营养液配方配制) 浇灌 1 次, 7 d 后每隔 2 d 用完全营养液浇灌 1 次。待幼苗达三叶一心时选生长正常的移入 LRH250-G 光照培养箱内 (光强 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 每天光照 12 h), 先于 12/10 (昼/夜) 环境下预处理 1 d, 再分别置于 5℃ 下处理 0, 12, 24, 36, 48 h, 然后每天取样测定。

细胞质膜透性的测定按杨根平等^[8]的方法, 以相对电解质渗透率表示。丙二醛 (MDA) 含量的测定采用硫代巴比妥酸法^[9], 以 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FM 表示 MDA 含量。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定按

收稿日期: 2001-07-16; 修回日期: 2002-01-07

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (399125); 农业部“蔬菜遗传与生理实验室”资助项目

*通讯作者 (Author for correspondence)。

Giannopolitis 等^[10]的方法测定, 以抑制氮蓝四唑 (NBT) 光化还原 50 % 为一个酶活性单位。过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定采用 Dhindsa 等^[11]的方法, 以每分钟减少 0.1 个 A 值所需的酶量为 1 个酶活性单位。可溶性蛋白质含量用考马斯亮蓝 G250 法测定, 以牛血清蛋白作标准。以上指标每处理分别取 10 株, 剪取幼苗第 2 片真叶混合测定, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 W7 与 Ca^{2+} 对低温胁迫茄子幼苗叶片细胞质膜透性的影响

从图 1 可以看出, 随低温胁迫时间的延长, 3 种处理电解质渗透率均表现为先上升后下降, 其中 W7 处理始终高于 Ca^{2+} 处理和对照 (去离子水处理); 在低温胁迫 36 h 时 3 种处理电解质渗透率均达最高峰, 此时 W7 处理分别比 Ca^{2+} 处理和对照增加 134.66 % 和 47.58 %; 低温胁迫 36 h 后 3 种处理电解质渗透率均呈下降的变化趋势。这表明 W7 处理使茄子幼苗细胞膜渗透率显著增加, 加重冷害对幼苗的伤害, 而 Ca^{2+} 处理却明显降低膜的渗透率, 提高幼苗抗冷性。

2.2 W7 和 Ca^{2+} 对冷胁迫下茄子幼苗叶片 MDA 含量的影响

不同处理茄子幼苗经 0 ~ 48 h 低温胁迫后, 叶片中过氧化产物 MDA 含量变化见图 2。低温处理前, Ca^{2+} 、W7、对照的 MDA 含量均较低, 随低温胁迫时间的延长, 3 种处理 MDA 含量均呈上升趋势。W7 处理在整个胁迫过程中 MDA 含量显著增加。与 W7 和对照相比, Ca^{2+} 处理显著降低了 MDA 的含量。在胁迫 48 h 时, Ca^{2+} 处理叶片 MDA 含量分别比 W7 处理和对照降低了 51.72 % 和 25.86 %。这表明 W7 通过抑制 Ca^{2+} -CaM 的形成使茄子幼苗体内 MDA 含量增加, 加剧了冷害对幼苗的伤害, 而 Ca^{2+} 通过促进 Ca^{2+} -CaM 的产生减缓了低温的伤害, 提高了幼苗的抗冷性。

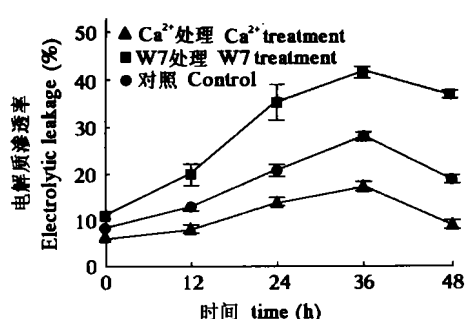


图 1 W7 和 Ca^{2+} 处理对冷害茄苗膜质透性的影响

Fig. 1 Effect of W7 and Ca^{2+} treatment of seeds on electrolytic leakage of eggplant seedling under chilling stress

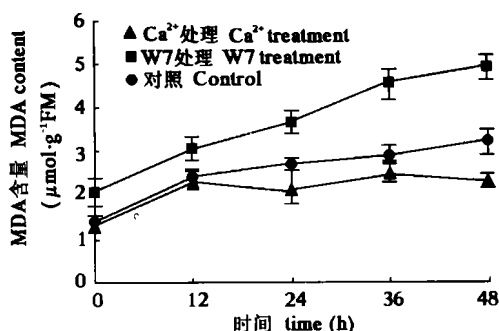


图 2 W7 和 Ca^{2+} 处理对冷害茄苗 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of W7 and Ca^{2+} treatment of seeds on MDA content of eggplant seedling under chilling stress

2.3 W7 与 Ca^{2+} 对冷胁迫下茄子幼苗叶片 SOD 活性的影响

较高的 SOD 活性是植物抵抗逆境胁迫的生理基础。图 3 表明, 低温胁迫前, 3 种处理叶片 SOD 活性并无显著差异。在低温胁迫 0 ~ 12 h 范围内 Ca^{2+} 处理和对照 SOD 活性同步上升, 在低温胁迫 12 ~ 48 h 范围内 Ca^{2+} 处理 SOD 活性一直显著高于对照。随低温处理时间的延长, W7 处理叶片 SOD 活性呈下降趋势且显著低于 Ca^{2+} 处理和对照。 Ca^{2+} 处理在低温胁迫 24 h 时 SOD 活性达最高峰, 比对照提前 12 h。在胁迫 24 h 时, W7 处理和对照 SOD 活性分别比 Ca^{2+} 处理降低 72.41 % 和 22.80 %。这说明 W7 通过抑制 Ca^{2+} -CaM 形成降低了 SOD 活性, Ca^{2+} 处理能显著促进 Ca^{2+} -CaM 形成并提高 SOD 活性, 并使之维持在较高的水平, 减轻了 O_2^- 自由基对茄子幼苗的伤害。

2.4 W7 与 Ca^{2+} 对冷胁迫下茄子幼苗叶片 CAT 活性的影响

CAT 对清除组织中的 H_2O_2 等有害自由基有重要的作用。由图 4 可以看出, 随低温胁迫时间的延长, Ca^{2+} 处理和对照叶片 CAT 活性均呈现先上升后下降的变化趋势, 并且 Ca^{2+} 处理在整个胁迫过程中显著高于对照和 W7 处理。在整个胁迫范围内 W7 处理 CAT 活性呈缓慢下降的变化趋势。在低温胁迫

迫 24 h 时, W7 处理和对照 CAT 活性分别比 Ca^{2+} 处理降低 74.90 % 和 31.71 %。这表明 W7 通过抑制 Ca^{2+} -CaM 的形成降低了 CAT 活性, 而 Ca^{2+} 处理由于促进 Ca^{2+} -CaM 信使系统的形成增强了 CAT 活性, 减缓了 H_2O_2 对茄子幼苗的伤害, 提高植株抗冷力。

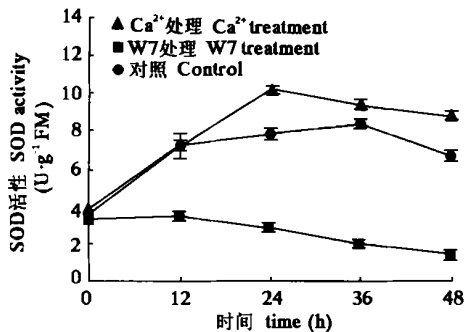


图3 W7 和 Ca^{2+} 浸种处理对冷害茄苗 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of W7 and Ca^{2+} treatment of seeds on SOD activity of eggplant seedling under chilling stress

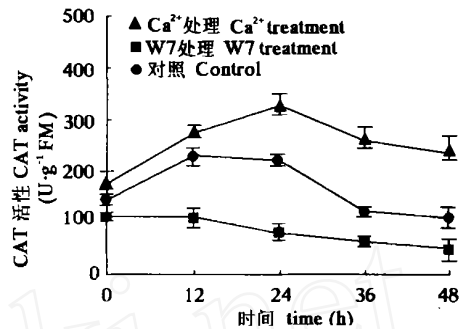


图4 W7 和 Ca^{2+} 浸种处理对冷害茄苗 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of W7 and Ca^{2+} treatment of seeds on CAT activity of eggplant seedling under chilling stress

2.5 W7 与 Ca^{2+} 对冷胁迫下茄子幼苗叶片可溶性蛋白含量的影响

图 5 表明, 3 种处理茄子幼苗叶片可溶性蛋白质含量在整个低温胁迫过程中也呈现先上升后下降的变化趋势, Ca^{2+} 处理始终显著高于对照和 W7 处理。在低温胁迫 24 h 时, 3 种处理可溶性蛋白质含量均达最大值, 此时 Ca^{2+} 处理分别比对照和 W7 处理增加 38.67 % 和 201.58 %。这表明 W7 通过抑制低温胁迫过程中 Ca^{2+} -CaM 信使的形成阻碍了可溶性蛋白质产生, Ca^{2+} 能促进冷害过程中可溶性蛋白质的合成, 可溶性蛋白质含量增加。

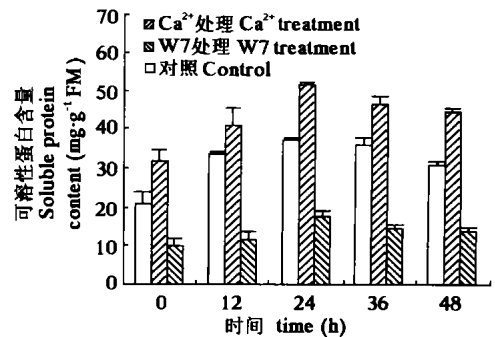


图5 W7 和 Ca^{2+} 浸种对冷害茄苗可溶性蛋白含量影响

Fig. 5 Effect of W7 and Ca^{2+} treatment of seeds on soluble protein content of eggplant seedling under chilling stress

3 讨论

低温伤害使细胞膜的结构和厚度发生变化, 破坏细胞内自由基清除与产生的动态平衡, 因 O_2^- 、 $^1\text{O}_2$ 、 OH^- 和 H_2O_2 等自由基的积累而引起膜脂过氧化和脱酯化作用, 引起蛋白质分子内和分子间的交联, 使细胞膜的结构和功能受到破坏。 Ca^{2+} 通过其浓度的变化对稳定双层脂层的基本结构、防止膜损伤和膜渗透、维持膜的完整性起着积极的作用^[12]。 Ca^{2+} 作为胞内功能的第二信使, 与受体 CaM 结合后会引发一系列与增强耐冷性有关的生理反应, 如 POD、SOD、CAT、ATPase 等酶的活性增强, 内源保护性物质增加等^[12,13]。本试验结果表明, W7 处理使低温胁迫后茄子幼苗叶片电解质渗透率显著升高, MDA 积累, SOD、CAT 活性持续下降, 而 Ca^{2+} 处理能明显缓解低温对茄子幼苗的伤害, 叶片电解质渗透率和 MDA 含量降低, SOD 和 CAT 的活性提高, 并使其活性维持在较高的水平上, 说明 Ca^{2+} -CaM 信使系统参与茄子幼苗抗冷反应, 这与梁颖^[14]和李卫^[15]的研究结果一致, 表明 Ca^{2+} -CaM 信使系统在茄子幼苗抗冷过程中参与酶活性的调节, W7 通过阻碍 Ca^{2+} -CaM 信使系统的转导, 通过影响质膜的结构导致细胞质膜透性的增加, 阻断外界刺激引发的生理反应, 使 SOD 和 CAT 酶活性降低, 而 Ca^{2+} 处理使叶片内游离态 Ca^{2+} 浓度增加, 可诱导类脂排列紧密, 增强膜的疏水性和稳定性, 保护细胞膜的完整性, 可使 SOD、CAT 等靶酶对 Ca^{2+} -CaM 的亲合性提高。

本试验结果表明低温胁迫下 W7 处理使可溶性蛋白质含量始终维持在一个较低的水平, 而 Ca^{2+} 处

理能显著增加可溶性蛋白质的含量。这与 Momroy^[16]的结果相符,表明 Ca^{2+} 与 CaM 结合后改变了基因的转录和蛋白质的合成模式, W7 由于抑制了 Ca^{2+} ·CaM 的形成,阻碍了可溶性蛋白质的合成,而 Ca^{2+} 处理通过促进 Ca^{2+} ·CaM 的合成,使可溶性蛋白质含量提高,植物受害减轻。

综上, Ca^{2+} 增强茄子幼苗抗冷性与叶片细胞内 Ca^{2+} ·CaM 信使系统密切相关, W7 导致茄子幼苗抗冷力下降的实质是 Ca^{2+} ·CaM 信使功能受阻。不同作物 Ca^{2+} ·CaM 信使作用机理有待进一步研究。在实际生产中,利用 Ca^{2+} 浸种可增强幼苗的抗冷性,这将为冬春保护地蔬菜育苗和生产提供理论依据。

参考文献:

- 1 Pandey S, Tiwari S B, Upadhyaya K C, et al. Calcium signaling: linking environmental signals to cellular functions. *Critical reviews in plant sciences*, 2000, 19 (4): 291 ~ 318
- 2 李美如, 刘鸿先, 王以柔, 等. 水稻幼苗冷锻炼过程中钙的效应. *植物学报*, 1996, 38 (9): 735 ~ 742
- 3 Palta J p. Role of calcium in plant responses to stresses: linking basic research to the solution of practical problems. *Hortscience*, 1996, 31 (1): 51 ~ 57
- 4 Gong M, Chen S N, Song Y, et al. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant system in maize seedling. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1997, 24: 371 ~ 379
- 5 刘志媛, 朱祝军, 钱亚榕, 等. 等渗 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 NaCl 对番茄幼苗生长的影响. *园艺学报*, 2001, 28 (1): 31 ~ 35
- 6 王朝晖, 孙大业. 植物钙调素研究进展. *植物学通报*, 1997, 85: 57 ~ 60
- 7 Hiroyoshi Hidaka, Yasuharu Sasaki, Toshio Tanaka, et al. N- (6-aminohexyl) -5-Chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78 (7): 4354 ~ 4357
- 8 杨根平, 高爱丽, 荆家海. 钙与渗透胁迫下大豆细胞膜透性的关系. *植物生理学通讯*, 1993, 29 (3): 179 ~ 181
- 9 Heath R L, L Packer. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem. Biophys*, 1986, 125: 189 ~ 198
- 10 Gannopolitis C N, Ries S K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedling. *Plant Physiol.*, 1977, 59: 315 ~ 318
- 11 Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A. Leaf senescence correlated with increase levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, 1982, 32: 91 ~ 101
- 12 雷江丽, 杜永臣, 朱德蔚, 等. 低温胁迫下不同耐冷性番茄品种幼叶细胞 Ca^{2+} 分布变化的差异. *园艺学报*, 2000, 27 (4): 269 ~ 275
- 13 Jian L C, Li J H, Chen W P, et al. Cytochemical localization of calcium and Ca^{2+} -ATPase activity in plant cell under chilling stress: a comparative study between the chilling-sensitive Maize and the chilling-insensitive winter wheat. *Plant cell physiol.*, 1999, 40 (10): 1061 ~ 1071
- 14 梁颖, 王三根. Ca^{2+} 对低温下水稻幼苗膜的保护作用. *作物学报*, 2001, 27 (1): 59 ~ 64
- 15 李卫, 孙中海, 章文才, 等. 钙与钙调素对柑橘原生质体抗冷性的影响. *植物生理学报*, 1997, 23 (3): 262 ~ 266
- 16 Monroy A F, Sarhan F, Dhindsa R S. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression: Evidence of a role of calcium. *Plant Physiol.*, 1993, 102: 1227 ~ 1235

The Effect of Calmodulin Antagonist and Calcium on Chilling Resistance of Eggplant Seedling

Gao Hongbo and Chen Guilin

(Department of horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: The effect of calmodulin antagonist W7 and Ca^{2+} on chilling resistance of eggplant seedlings were studied. Seed soaking with W7 distinctly enhanced the contents of electrolyte leakage and malondialdehyde (MDA), reduced the activities of superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT) and the content of soluble protein of eggplant seedling leaves under chilling stress, seed soaking with Ca^{2+} solution obviously decreased the contents of electrolyte leakage and MDA, increased the activities of SOD, CAT and the content of soluble protein of leaves. The result suggests that Ca^{2+} ·CaM messenger system plays an important role in controlling chilling resistance of eggplant seedling.

Key words: Calmodulin antagonist; Ca^{2+} ; Eggplant; Chilling resistance