

钙处理对乙烯诱导的番茄离体花柄脱落的抑制作用

许涛, 李天来*, 齐明芳

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110161)

摘要: 以番茄‘辽园多丽’的小花为材料, 研究外源乙烯 ($20 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理下, 花柄脱落过程中, 离区微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase、羧甲基纤维素钠酶 (CMC-Na)、内切多聚半乳糖醛酸酶 (Endo-PG) 和果胶酯酶 (PE) 等活性的变化。结果表明: 外源乙烯加速了花柄的脱落, 刺激了其离区的 Ca^{2+} -ATPase 活性先升高后下降, 随后离区 CMC-Na、Endo-PG、PE 活性升高; 钙离子专一性螯合剂 EGTA 和钙调素拮抗剂 TFP 均在一定程度上抑制了乙烯诱导的上述反应, 表明细胞内 Ca^{2+} 与 CaM 参与了乙烯反应。

关键词: 番茄; 脱落; 乙烯; 水解酶; 钙

中图分类号: S 641.2 **文章标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0366-05

Physiological Regulation of Calcium in Tomato Pedicel in Vitro During Abscission Induced by Ethylene

XU Tao, LI Tian-lai*, and QI Ming-fang

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Liaoning Province Key Laboratory of Protected Horticulture, Shenyang 110161, China)

Abstract: In an experiment, pedicels of *Lycopersicon esculentum* Mill ‘Liaoyuanduoli’ were used to study the changes of Ca^{2+} -ATPase activity, abscission rate and the activity of Endo-PG, PE, CMC-Na enzymes in abscission zone after the pedicels were incubated in exogenous ethylene ($20 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$). The results showed that ethylene could accelerate the abscission during incubation, Ca^{2+} -ATPase activity first rose sharply and then declined quickly. Subsequently, there was an increase in the activity of Endo-PG, PE, CMC-Na enzyme in abscission zone. Calmodulin antagonist trifluoperazine (TFP) and Ca^{2+} chelator EGTA both inhibited the effects induced by ethylene to a certain extent. It is concluded that Ca^{2+} and CaM participate in the reaction of exogenous ethylene.

Key words: Tomato; Abscission; Ethylene; Hydrolysis enzyme; Calcium

器官脱落是自然界中普遍发生的生理现象, 在番茄 (Seung-Beom et al, 2000)、棉花以及菜豆 (Thompson & Osborne, 1994) 等栽培作物中最引人关注。许多研究者对植物器官脱落进行了深入研究。

乙烯作为植物衰老进程中的重要调控因子, 已经明确了其在器官脱落中的重要作用 (Jacksen et al, 1973; Reid, 1985; Roberts et al, 2000)。现已证明, 乙烯诱导的脱落与水解酶活性密切相关。其中 CMC-Na 酶 (羧甲基纤维素钠酶) 作为纤维素酶之一, 能水解植物细胞壁中的纤维素、木聚糖以及其它类型葡聚糖结构中的 -1, 4 键, 与其它多种降解酶共同作用, 导致细胞壁纤维素的完全降解。

Endo-PG (多聚半乳糖醛酸酶) 主要参与降解大分子底物上非还原末端的单体。PE (果胶酯酶) 能使果胶中的甲脂水解, 生成果胶酸。

收稿日期: 2006 - 11 - 30; 修回日期: 2007 - 01 - 19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571265)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ltl@syau.edu.cn)

近些年来研究表明, 第二信使 Ca^{2+} 不仅参与乙烯诱导生理生化反应和基因表达以及调节植物衰老和脱落等凋亡过程中的信号转导, 而且脱落过程中水解酶类如纤维素、多聚半乳糖醛酸酶以及果胶酯酶等也受到钙的调控 (Riov, 1974; del Campillo & Bennett, 1996; Kwak, 1997)。依赖 CaM 调节的 Ca^{2+} -ATPase 是 Ca^{2+} 恒态调控系统重要组分之一, 它可以将细胞质内由于刺激升高的 Ca^{2+} 源源不断地转运到胞外或细胞器贮藏起来, 使胞质恢复到刺激前的水平, 维持细胞质内的低 Ca^{2+} 浓度, 以便钙发挥其信使作用和保持细胞正常生理活动 (孙大业 等, 2003)。

作者在室内可控条件下, 通过外源施用 Ca^{2+} 专一螯合剂 EGTA 和钙调素抑制剂 TFP 处理, 研究了乙烯条件下钙对番茄离体小花柄的脱落和脱落过程中微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性、CMC-Na、Endo-PG 以及 PE 活性的影响, 以探讨细胞内 Ca^{2+} 和 CaM 是否参与乙烯诱导脱落的过程。

1 材料与方法

1.1 材料

供试番茄品种为‘辽园多丽’。2004年2月18日播种, 4月9日定植于日光温室内, 正常栽培管理。5月上旬, 当植株第1花序处于开花期时, 取各株相同或相近位置花序上的小花 (小花花柄离层上下长度和子房、雌雄蕊大小均正常, 花瓣全部呈90°打开或者只有一瓣未打开, 花瓣呈新鲜的黄色), 剪去花柄上端花冠, 只留小花柄部分 (4 cm), 插入事先准备好的装有1%琼脂培养基的培养皿中。

培养基分别设 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFP 和无离子水 3 个处理, 并将其放入 $39 \text{ cm} \times 24 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 底部开口的玻璃培养箱中, 底部用水密封。以空气为对照, 乙烯处理浓度为 $20 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将这些气体从玻璃培养箱侧壁的小孔注入。每个培养皿插入 50 个小花柄, 3 次重复。

1.2 调查与测定

定时记录脱落花柄数量, 计算脱落率。用镊子沿花柄上段弯曲的方向轻碰一次就断裂者即被认为脱落 (王彦昌 等, 2003)。

剪切长度为 1.5 cm 左右的离区样品, 经液氮速冻, 于 -75°C 保存, 用于酶活性测定。

Ca^{2+} -ATPase 活性的测定: 参照樊秀彩和关军锋 (2003) 的方法有改动, 微粒体膜经过研磨匀浆, 4 层纱布过滤, 离心后, 悬浮匀浆得到微粒体悬浮液, 用于蛋白浓度测定和微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性测定, 使用 20% 的三氯乙酸终止反应, 用考马斯 G250 亮蓝法测定蛋白质含量。Endo-PG 活性的测定: 以 0.6% 柑橘果胶为反应底物, 每克组织每小时内黏度下降 1% 作为一个酶活单位 (Riov, 1974)。

PE 测定方法: 以柑橘果胶 (Citrus pectin) 为底物, 反应液为: 9 mL 1% 柑橘果胶 + 1 mL 酶液, 每克组织每小时内维持 pH 7.4 所需要的 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 的体积作为一个酶活单位 (Artes et al., 1996)。

CMC-Na 的测定方法: 以 1.2% CMC-Na 为反应底物, 每克组织每小时内黏度下降 1% 作为一个单位 (Kondo et al., 2002)。

2 结果与分析

2.1 不同处理对番茄外植体脱落率的影响

图 1 表明, 随着离体培养时间的延长, 花柄脱落率不断提高, 外源乙烯处理的花柄脱落率提高速度最快, 处理 8 h 以后, 明显高于空气对照, 处理 16 h 的脱落率高达 70% 以上, 处理 24 h 以内 100% 脱落, 而空气对照在处理 16、24 和 32 h 的脱落率分别为 40%、62% 和 87%, 乙烯处理 16 h 和 24 h 较对照分别提高 80% 和 61%。与乙烯处理相比, 乙烯 + EGTA 和乙烯 + TFP 处理明显降低了脱落率, 但与空气对照差异不明显, 表明钙离子专一螯合剂 EGTA 和钙调素抑制剂 TFP 可以抑制外源乙烯

促进花柄外植体脱落的作用,进而可以说明番茄小花柄外植体中的钙及钙调素参与了乙烯促进花柄脱落的调控作用。

2.2 不同处理对番茄外植体离区 Ca^{2+} -ATPase活性的影响

从图 2可以看出,乙烯处理 8 h可以显著提高番茄小花柄微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase的活性,随后活性迅速下降,酶活性的峰值较空气处理提前了 8 h。

乙烯 + EGTA和乙烯 + TFP处理明显降低了活性,在整个脱落过程中均较空气对照的低,但变化趋势与对照相一致。

与单纯乙烯处理相比,乙烯 + EGTA和乙烯 + TFP处理 8 h,明显抑制了对微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase活性提高的促进作用。

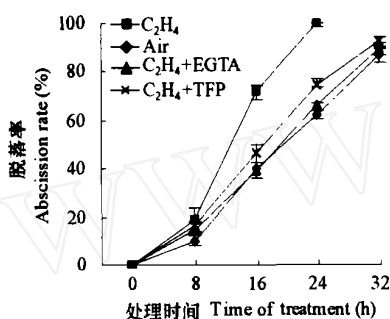


图 1 不同处理对番茄离体花柄外植体脱落的影响

Fig. 1 Changes of abscission rate of pedicels in different treatments

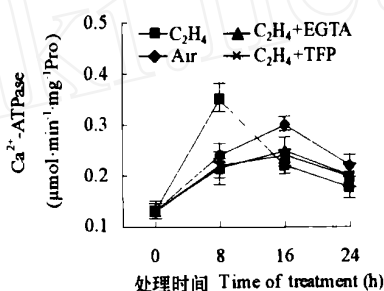


图 2 不同处理对番茄离体花柄外植体 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

Fig. 2 Changes of Ca^{2+} -ATPase activity of pedicels in different treatments

2.3 不同处理对番茄外植体离区 PE活性的影响

从图 3可以看出,乙烯处理 PE活性均高于其他处理,乙烯 + EGTA和乙烯 + TFP处理的与空气对照无明显差异,而且变化趋势与空气处理也相似。说明番茄花柄外植体中的 EGTA和 TFP抑制了乙烯促进 PE活性升高的作用。

2.4 不同处理对番茄外植体离区 Endo-PG活性的影响

如图 4所示,番茄小花柄 Endo-PG活性随着处理时间的延长呈上升趋势。乙烯处理的活性明显高于空气对照。

EGTA和 TFP抑制了乙烯的作用,乙烯 + EGTA和乙烯 + TFP处理 24 h时,Endo-PG酶活性仅为乙烯处理的 54.1%和 67.9%。

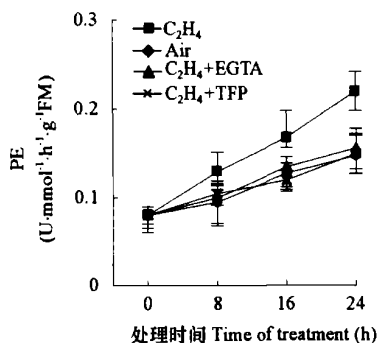


图 3 不同处理对番茄离体花柄外植体 PE 活性的影响

Fig. 3 Changes of PE activity of pedicels in different treatments

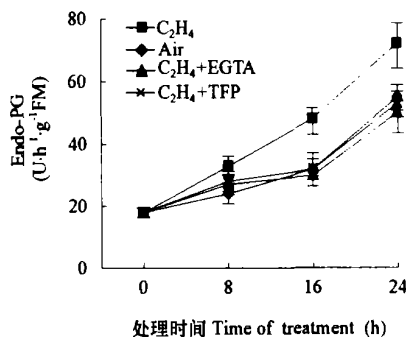


图 4 不同处理对番茄离体花柄外植体 Endo-PG 活性的影响

Fig. 4 Changes of Endo-PG activity of pedicels in different treatments

2.5 不同处理对番茄外植体离区 CMC-Na 酶活性的影响

乙烯处理可以明显提高番茄小花柄 CMC-Na 酶的活性, 随着脱落反应的进行, CMC-Na 酶活性逐渐增加并高于对照。与乙烯处理相比, 乙烯 + EGTA 和乙烯 + TFP 处理的活性明显降低, 在处理 16 h, 活性分别为乙烯处理的 76% 和 79%, 但与空气对照差异不明显。该结果说明, EGTA 和 TFP 处理能抑制外源乙烯对外植体 CMC-Na 酶活性提高的诱导作用 (图 5)。

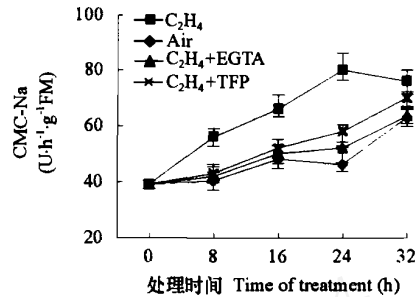


图 5 不同处理对番茄离体花柄外植体 CMC-Na 活性的影响

Fig. 5 Changes of CMC-Na activity of pedicels in different treatments

3 讨论

Iwahori 和 Kai (1994) 利用 X-射线能谱技术定位分析证明, 柠檬叶片外植体脱落时, 离层细胞壁与液泡中 Ca^{2+} 总量降低, IAA 延缓脱落时, 离层维持高的 Ca^{2+} 含量。

现已证明外源钙抑制多种水解酶的活性, 并减少乙烯释放量 (Conway & Sams, 1984; 叶钢等, 1993)。Tirlapur 和 Costa (1995) 利用 CTC- Ca^{2+} 荧光方法测定膜结合态的 Ca^{2+} 分布变化表明, 桃果实脱落前, 离层细胞与花柄近轴端花梗的 CTC- Ca^{2+} 荧光程度相似; 脱落开始时, 离层细胞中膜结合态的 Ca^{2+} 瞬时增多, 这时可能刺激某些水解酶 (如激活 PG, 纤维素酶), 由此进一步促发了离层细胞解离。

此外已有很多试验证明, 作为第二信使的胞内钙信使系统参加了乙烯信号的传导过程 (Raz & Fluhr, 1992)。胞内钙可能是作为一种媒介参与乙烯对加速器官衰老脱落的全过程。

前人研究发现, 外源施钙对植物器官的脱落, 因所使用的钙浓度以及植物种类不同而效果不同。Elmo 等 (1974) 研究发现, 棉花和菜豆在栽培条件下补充钙, 即使离区中的钙显著增加, 其在乙烯诱导的条件下也没有抑制脱落的效果。而 Poovaiah 和 Leopold (1973) 在用浸泡法钙处理菜豆叶柄外植体后, 发现钙可以延缓其在乙烯条件下的脱落进程。分析这些结果不同的原因主要是由于施用钙的方法不同, 以及不同的植物对钙和乙烯刺激有不同的反应所造成的。

本试验中, 施用钙及钙调素的抑制剂延缓了乙烯诱导的脱落进程, 可能是抑制剂阻止了乙烯钙信号的产生和传递, 降低了乙烯对脱落的加速作用, 从而延缓了脱落的进程。

由于 Ca^{2+} -ATP 在维持细胞质 Ca^{2+} 稳态方面发挥重要作用, 推测 Ca^{2+} -ATP 的下降将使细胞内的 Ca^{2+} 水平升高, 干扰细胞正常代谢以及钙信使的运转 (Poovaiah, 1988; Brown, 1997)。联系到水解酶活性的上升和脱落率的增加, 结果显示 Ca^{2+} -ATP 活性上升在前, 而水解酶活性和脱落率显著升高在后, 推断 Ca^{2+} -ATP 活性上升是脱落的一个早期信号。

此外由于植物细胞中存在不同类型的 Ca^{2+} -ATPase, 钙调素抑制剂 TFP 对番茄离区的 Ca^{2+} -ATP 活性有抑制作用, 表明番茄花柄离区的 Ca^{2+} -ATPase 对 CaM 敏感, 反映出番茄存在着 PM 型 Ca^{2+} -ATPase。

本试验中, 外源乙烯处理可以刺激水解酶活性的升高, 加速番茄花柄的脱落。而钙调素拮抗剂 TFP 和钙离子专一螯合剂 EGTA 可在一定程度上逆转这一作用, 间接证明乙烯对外植体脱落的诱导与胞外 Ca^{2+} 内流引起的胞质 Ca^{2+} 浓度增加密切相关, 同时也暗示 CaM 参与了乙烯的诱导过程。

References

- Artes F, Cano A, Fem T. 1996. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. Food Sci, 61 (2): 311 - 313.

- Brown K M. 1997. Ethylene and abscission. *Plant physiology*, 100: 567 - 576.
- del Campillo E, Bennett A B. 1996. Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiology*, 111: 813 - 820.
- Elmo M, Beyer Jr Bruno, Quebedeaux. 1974. The effect of calcium nutrition on ethylene induced abscission. *Plant Physiol*, 54: 788 - 790.
- Fan Xiu-cai, Guan Jun-feng. 2003. Microsomal membrane Ca^{2+} -ATPase activity and lipid peroxidation level during senescence of postharvest strawberry fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 15 - 18. (in Chinese)
- 樊秀彩, 关军锋. 2003. 草莓采后微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase活性与膜脂过氧化水平. *园艺学报*, 30 (1): 15 - 18.
- Iwahori S, Kai R. 1994. Subcellular location of calcium ion within cells of the abscission layer of citrus leaf explants during abscission. *Japan Soc Hort Sci*, 63: 45 - 50.
- Jackson M B, Harley C, Daphne J Osborne. 1973. Timing abscission in *Phaseolus vulgaris* L. by controlling ethylene production and sensitivity to ethylene. *New Phytologist*, 72: 1251 - 1260.
- Kondo S, Nimitkeatkai H, Susan L, Carlos H. 2002. Cell wall metabolism during development of rambutan fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77 (3): 300 - 304.
- Kwak S H. 1997. The requirements for Ca^{2+} , protein phosphorylation and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol*, 38: 1142 - 1149.
- Poovaliah B W. 1988. Molecular and cellular aspects of calcium action in plants. *Hort Sci*, 23: 267 - 271.
- Poovaliah B W, Leopold A C. 1973. Inhibition of abscission by calcium. *Plant Physiol*, 51: 848 - 851.
- Raz V, Fluhr R. 1992. Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plant Cell*, 4: 1123 - 1127.
- Reid M S. 1985. Ethylene and abscission. *HortScience*, 20: 45 - 50.
- Rioy J A. 1974. Polygalacturonase from citrus leaf explants. *Plant Physiology*, 53: 312 - 316.
- Roberts J A, Whitelaw C A, Gonzalez-Carranza Z H. 2000. Cell separation process in plants: models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany*, 86: 223 - 235.
- Sams C E, Conway W S. 1984. Effects of calcium infiltration on ethylene production, respiration rate, soluble pectin content, and quality of 'Golden Delicious' apple fruit. *Amer Soc Hort Sci*, 109: 53 - 57.
- Seung-Beom Hong, Roy Sexton, Mark L Tucker. 2000. Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiology*, 123: 869 - 871.
- Sun Da-ye, Shang Zhong-lin, Mao Guo-hong. 2003. The specificity of calcium signaling in plant cells. *Plant Physiology Communications*, 39 (2): 93 - 100. (in Chinese)
- 孙大业, 尚忠林, 毛国红. 2003. 植物细胞内钙信号的特异性. *植物生理学通讯*, 39 (2): 93 - 100.
- Thompson D S, Osborne D J. 1994. A role for the stele in intertissue signaling in the initiation of abscission in bean leaves. *Plant Physiology*, 105: 341 - 349.
- Tirlapur U K, Costa G. 1995. Scanning electron microscopy, video image analysis and confocal imaging of changes occurring during peach fruit abscission. *Amer Sci*, 120: 203 - 210.
- Wang Yan-chang, Li Tian-lai, Hou Jian-ping. 2003. Effect of ethylene on abscission of tomato pedicel in vitro. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (5): 554 - 558. (in Chinese)
- 王彦昌, 李天来, 侯建平. 2003. 乙烯处理对番茄离体小花柄脱落的影响. *园艺学报*, 30 (5): 554 - 558.
- Ye Gang, Miao Ying, Mao Jie-qi. 1993. Effect of the postharvest treatment of *Citrus* fruits with calcium on the senescence and activities of cellulase and pectolases. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 19 (4): 450 - 454. (in Chinese)
- 叶 钢, 缪 颖, 毛节琦. 1993. 结果采后钙处理对纤维素酶和果胶酶的影响. *浙江农业大学学报*, 19 (4): 450 - 454.