

钙与钙调素对番茄果实乙烯生物合成和信号转导基因表达的调控

王文雅^{1,3}, 吕 静², 朱本忠¹, 常世敏⁴, 翟百强¹, 罗云波¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学 生物学院微生物系, 北京 100094;
3. 北京化工大学 生命学院, 北京 100029; 4. 河北工程学院 食品科学技术系, 河北 邯郸 057150)

摘要: 为了研究 CaM 和 Ca^{2+} 在调控乙烯生物合成和信号转导组分基因表达中的相互关系, 利用 272 mmol/L CaCl_2 及 272 mmol/L CaCl_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ W5(或 W7)处理绿熟期番茄果实圆片, 然后采用无菌培养的方法在 20 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行培养。结果表明: CaCl_2 处理能够抑制番茄果实圆片的乙烯生成, 抑制 LeACO1, NR, LeERF2 基因的表达, 而 CaCl_2 + W5(或 W7)能消除 Ca^{2+} 对果实圆片乙烯生成及 LeACO1, NR, LeERF2 基因的表达的抑制作用, 但 CaCl_2 和 CaCl_2 + W5(或 W7)处理均对 LeACS2 基因表达影响不明显。以上研究结果表明外源钙处理对乙烯生物合成和信号转导途径中相关基因表达的影响可能与 CaM 有关。

关键词: 钙调素; 钙; 乙烯; 基因表达

中图分类号: S641.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)01-0001-05

Effect of Calcium and Calmodulin on the Expression of Genes in Ethylene Biosynthesis and Ethylene Signal Transduction

WANG Wen-ya^{1,3}, LÜ Jing², ZHU Ben-zhong¹, CHANG Shi-min⁴, ZHAI Bai-qiang¹, LUO Yun-bo¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. State Key Laboratory for Agricultural Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;
4. Department of Food Science, Hebei Institute of Technology, Handan 057150, China)

Abstract: In order to address the role that calmodulin plays in the regulation mechanism of calcium on the genes expression of ethylene biosynthesis and signal transduction pathway, the studies were carried out. Discs excised from tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* cv. Lichun) at mature green stage were treated with 272 mmol/L CaCl_2 or 272 mmol/L CaCl_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ W5/W7 solution, and then cultured under the aseptic conditions at 20 $^{\circ}\text{C}$. The results showed that both ethylene production and expression of LeACO1, NR, LeERF2 genes could be inhibited by CaCl_2 treatment, and CaCl_2 + W5/W7 treatment could prevent the inhibitory effect of CaCl_2 treatment on ethylene production and expression of LeACO1, NR, LeERF2 genes. However, either CaCl_2 or CaCl_2 + W5/W7 treatment has little effect on the expression of LeACS2 gene. These indicated that the inhibitory effect of CaCl_2 on expression of genes in ethylene biosynthesis and ethylene signal transduction pathway might be related to calmodulin.

Key words: Calmodulin; Calcium; Ethylene; Gene expression

钙调素 (CaM) 是胞内钙受体, 它与 Ca^{2+} 信使结合, 激活下游的蛋白激酶, 从而诱导一系列的生理生

收稿日期: 2004-08-16

基金项目: 国家重点基础研究规划 (973) (G1999077701) 项目资助

作者简介: 王文雅 (1975-), 河北保定人, 博士, 主要从事乙烯信号转导及果蔬采后生物技术研究工作。

化反应。研究表明, CaM 与果实的成熟衰老过程有密切的关系^[1~3]。Ca²⁺ 处理能够延缓果蔬成熟衰老过程, 抑制衰老相关酶的活性、延缓果实软化^[4], 因此 Ca²⁺ 处理成为果蔬采后保鲜处理的常用方式。Ca²⁺ 抑制果蔬成熟衰老的机理之一是其能够抑制乙烯的生成。一些研究者认为, Ca²⁺ 能够抑制胞内乙烯的前体物质——ACC 的跨膜运输^[5], 或者抑制 ACC 氧化酶的活性而抑制乙烯的生成^[6]。Njoroge^[7] 和 Tanaka^[8] 研究表明, Ca²⁺ 对乙烯生成的影响与 CaM 有关。由此可见, Ca²⁺ 对乙烯生成的调控作用是从多方面来进行的, 而 CaM 参与了 Ca²⁺ 对乙烯合成的调控。但在调控乙烯生物合成和信号转导关键基因表达中, CaM 和 Ca²⁺ 的相互关系目前尚未见报道。本文利用 CaM 抑制剂和 CaCl₂ 溶液处理番茄果实圆片, 目的是研究 CaM 在 Ca²⁺ 调控乙烯生物合成和信号转导组分基因表达中的作用, 为 Ca²⁺ 抑制乙烯生物合成及调控果实成熟衰老的机理研究提供试验证据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料品种为丽春番茄 (*Lycopersicon esculentum* cv. Lichun), 于 2002, 2003 年春播种于中国农大科学园试验田内。花期挂牌, 花后 30~40 d 采摘大小一致、果型周正、没有生理病害和损伤的绿熟期番茄果实制作番茄果实圆片。

圆片制作及培养过程参照 Campbell^[8] 的方法, 略有改动。果实圆片制作和培养过程均为无菌操作。具体过程如下: 在超净工作台内, 将番茄果实用次氯酸钠溶液消毒 10 min, 然后无菌水冲洗干净。打孔器(内径 1.0 cm)用酒精浸泡消毒, 使用前将附着在其表面的酒精燃烧除去, 待打孔器冷却后, 从果实中部打孔取材。用手术刀将果实圆片内表皮切除, 得到直径为 1.0 cm, 厚度为 0.5~0.8 cm 的果实圆片, 用无菌水冲洗圆片。无菌水冲洗后, 用灭菌的滤纸将圆片表面的水分吸干。然后将圆片外表皮向下放入 60 mm 培养皿中, 用封口膜密封培养皿, 放入干燥器中 20 ℃ 恒温培养, 其间不断充入水蒸气饱和的空气, 以除去空气中的乙烯气体, 并保持组织圆片的含水量。

在圆片培养 12 h 后, 再用移液器向圆片中心加入 20 μ L 处理药剂, 继续培养 48 h。所有药品均经过滤除菌。处理药剂中 CaCl₂ 溶液的终浓度为 272

mmol/L, W5 为 100 μ mol/L, W7 为 100 μ mol/L。对照处理为无菌水处理。

1.2 乙烯的测定

乙烯含量采用导津 GC-14C 型气相色谱仪测定, GDX-502 填充柱, 柱长 1.5 m, 氢火焰离子探测器检测, 载气为 N₂, 燃气为 H₂, 流量为 50 mL/min; 检测器的温度为 160 ℃, 进样口温度为 120 ℃, 柱温 60 ℃。用胶塞将番茄果实圆片封闭在三角瓶内, 1 h 后抽气测定, 测定重复 3 次。

1.3 RNA 提取和 Northern 杂交

RNA 提取方法参照 ZHANG^[9] 的方法。采用随机 DNA 引物标记试剂盒 (Random Primed DNA Labelling Kit, TaKara 产品) 进行同位素标记探针的制备。用 HybaidTM 小型旋转杂交炉进行杂交反应, 杂交液为 Church & Gilbert buffer。尼龙膜经 60 ℃ 预杂交 6 h 后, 加入经 ³²P 标记的 LeACS2, LeACO1, NR, LeERF2 探针杂交 24 h。随后洗涤杂交膜: 2 \times SSC 和 1% SDS 室温 5 min, 1 次; 2 \times SSC 和 1% SDS 55 ℃ 10 min, 1 次; 0.1 \times SSC 和 1% SDS 55 ℃ 10 min, 1 次。洗后的杂交膜用保鲜膜包好, 放入增感屏中, 暗室中压入 X 光片, -70 ℃ 放置 7 d, 然后洗片显像。

杂交探针 LeACS2, LeACO1, NR, LeERF2 为中国农业大学食品科学与营养工程学院采后生物技术实验室自己保存^[10~13]。

本试验所有数据用 Excell 软件进行数据处理、制图, 图中数据点上的误差线代表该数据的标准差。

2 结果与分析

2.1 Ca²⁺ 和钙调素抑制剂处理对番茄果实圆片乙烯生成的影响

在果实的贮藏过程中, Ca²⁺ 处理能够延缓果实的成熟衰老, 提高贮藏品质。同时, Ca²⁺ 作为细胞信号转导过程中第二信使, 调控着胞内很多生理反应。钙调素是 Ca²⁺ 信号重要受体之一, W5 和 W7 是钙调素的抑制剂, W7 对钙调素的抑制效率高于 W5, 因此在试验中往往用 W5 作为 W7 参照物。

图 1 所示为 CaCl₂ 单独处理及 CaCl₂ 和钙调素抑制剂一同处理对番茄果实圆片乙烯生成量的影响。结果表明, Ca²⁺ 抑制番茄果实圆片乙烯的释放, 钙调素抑制剂能够消除 Ca²⁺ 对乙烯生成的抑制作用。CaCl₂ + W5 处理果实圆片乙烯释放量 (以湿重计, 下同) 为 0.70 nL/(g \cdot h), 是 CaCl₂ 单独处理番

茄果实圆片乙烯释放量的 1.4 倍 ($0.49 \text{ nL}/(\text{g}\cdot\text{h})$), 而 $\text{CaCl}_2 + \text{W7}$ 处理果实圆片乙烯释放量是 CaCl_2 单独处理番茄果实圆片乙烯释放量的 3.9 倍, 达到了 $1.89 \text{ nL}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

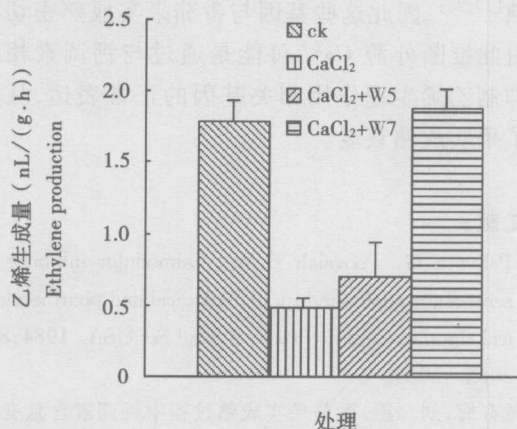
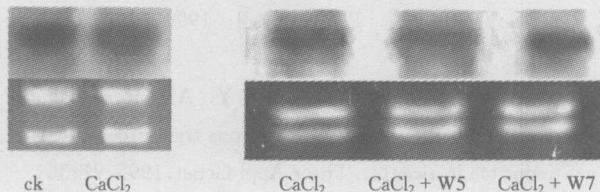


图 1 Ca^{2+} 和钙调素抑制剂处理对绿熟期番茄果实圆片乙烯释放量的影响

Fig.1 The effect of Ca^{2+} and CaM inhibitor on ethylene production in wild type tomato discs, excised from mature green tomatoes

2.2 Ca^{2+} 和钙调素抑制剂处理对番茄果实圆片 LeACO1、LeACS2 表达的影响

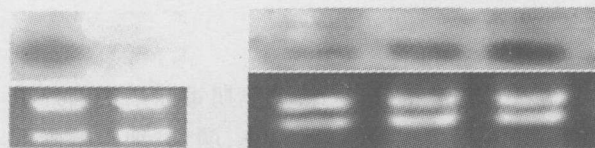
ACC 合酶 (ACC synthase) 和 ACC 氧化酶 (ACC oxidase) 是乙烯生物合成过程中的两个关键酶。ACC 合酶催化 S-腺苷蛋氨酸向 ACC 的转化, 而 ACC 氧化酶负责将 ACC 转化为乙烯。分子生物学的研究表明, ACC 合酶和 ACC 氧化酶是由多基因家族编码的, LeACS2, LeACO1 是番茄 ACC 合酶和 ACC 氧化酶家族成员, 催化番茄果实成熟过程中跃变乙烯的大量合成^[14,15]。试验结果表明, Ca^{2+} 处理抑制 LeACO1 基因的表达, 而钙调素抑制剂则明显抑制 Ca^{2+} 对 LeACO1 的作用, 引起 LeACO1 基因表达量的增加。但对 LeACS2 基因表达影响, Ca^{2+} 处理和钙调素抑制剂处理的作用均不明显 (图 2, 3)。



(A) CaCl_2 单独处理对 LeACS2 表达的影响; (B) CaCl_2 和钙调素抑制剂一同处理对 LeACS2 表达的影响
(A) The effect of CaCl_2 on expression of LeACS2; (B) The effect of CaCl_2 and CaM inhibitor on the expression of LeACS2

图 2 Ca^{2+} 和钙调素抑制剂处理对绿熟期番茄果实圆片 LeACS2 表达的影响

Fig.2 The effect of CaM inhibitor on the expression of LeACS2 in wild type tomato discs, excised from mature green tomatoes



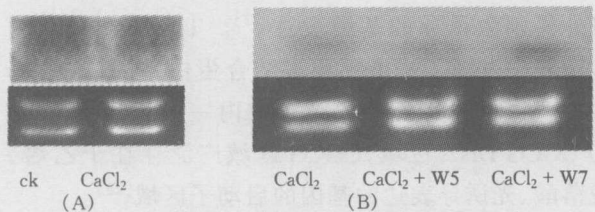
ck CaCl_2 CaCl_2 $\text{CaCl}_2 + \text{W5}$ $\text{CaCl}_2 + \text{W7}$
(A) CaCl_2 单独处理对 LeACO1 表达的影响; (B) CaCl_2 和钙调素抑制剂一同处理对 LeACO1 表达的影响
(A) The effect of CaCl_2 on expression of LeACO1; (B) The effect of CaCl_2 and CaM inhibitor on the expression of LeACO1

图 3 Ca^{2+} 和钙调素抑制剂处理对绿熟期番茄果实圆片 LeACO1 表达的影响

Fig.3 The effect of CaM inhibitor on the expression of LeACO1 in wild type tomato discs, excised from mature green tomatoes

2.3 钙调素抑制剂对 Ca^{2+} 处理番茄果实圆片 NR、LeERF2 基因表达的影响

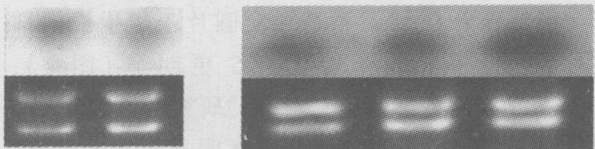
NR 是乙烯的受体基因之一, 在果实成熟过程中 NR 的表达量迅速增加, 因此系统 I 乙烯向系统 II 乙烯的过渡可能与 NR mRNA 的积累有关^[16]。LeERF2 是新近克隆出来的乙烯反应调控因子 (ERFs), 其基因表达受到乙烯的正调控^[13]。从图中可以看出, 与 LeACO1 基因表达变化相似, NR 和 LeERF2 基因的表达均受到 Ca^{2+} 处理的抑制, 而钙调素抑制剂处理则降低了 Ca^{2+} 对两基因表达的抑制作用 (图 4, 5)。



ck CaCl_2 CaCl_2 $\text{CaCl}_2 + \text{W5}$ $\text{CaCl}_2 + \text{W7}$
(A) CaCl_2 单独处理对 NR 表达的影响; (B) CaCl_2 和钙调素抑制剂一同处理对 NR 表达的影响
(A) The effect of CaCl_2 on expression of NR; (B) The effect of CaCl_2 and CaM inhibitor on the expression of NR

图 4 Ca^{2+} 和钙调素抑制剂处理对绿熟期番茄果实圆片 NR 表达的影响

Fig.4 The effect of CaM inhibitor on the expression of NR in wild type tomato discs, excised from mature green tomatoes



ck CaCl_2 CaCl_2 $\text{CaCl}_2 + \text{W5}$ $\text{CaCl}_2 + \text{W7}$
(A) CaCl_2 单独处理对 LeERF2 表达的影响; (B) CaCl_2 和钙调素抑制剂一同处理对 LeERF2 表达的影响
(A) The effect of CaCl_2 on expression of LeERF2; (B) The effect of CaCl_2 and CaM inhibitor on the expression of LeERF2

图 5 Ca^{2+} 和钙调素抑制剂处理对绿熟期番茄果实圆片 LeERF2 表达的影响

Fig.5 The effect of CaM inhibitor on the expression of LeERF2 in wild type tomato discs, excised from mature green tomatoes

3 讨论

在无菌培养的条件下,绿熟期番茄果实圆片成熟过程中乙烯生成量、呼吸速率、颜色、细胞壁降解相关酶及胞壁成份的变化与番茄整果成熟过程相应成份的变化相似^[8,11],同时果实圆片无菌培养的方法克服了整果果实间生理状态不一致、药剂处理在果实的不同部位存在剂量差异、一些试剂由于价格昂贵不能用来处理整果等的缺点^[8],因此果实圆片无菌培养的方法已被许多实验室采用,来研究番茄果实的成熟机制及成熟过程中的生理生化变化^[17-19]。

钙调素(calmodulin, CaM)是一个广泛存在于真核细胞生物中的多功能蛋白,至少有 30 多种靶蛋白或靶酶^[20]。CaM 本身没有酶活性,但与 Ca^{2+} 结合后能调节细胞内一些靶蛋白的活性,介导调控由 Ca^{2+} 引起的一系列生理生化反应,如细胞内酶活性调节、光合作用、孢子和种子及花粉的萌发、激素反应等,并参与调节细胞的增生、分化、运动等基本代谢过程^[21]。除此之外,CaM 还调控基因的表达,研究表明,CaM 参与调控光敏素相关基因表达^[22]、乙烯受体基因的表达^[12],而钙调素抑制剂能够完全抑制外界刺激诱导的基因表达^[22]。Tianbao 等^[23]在拟南芥中发现了一个钙调素结合蛋白基因,这个基因的产物能够特异性的结合核内一段长度为 6 bp 的 CGCG DNA 区域,CGCG 区域广泛存在于乙烯、脱落酸、光诱导表达的基因的启动子区域^[23]。

Ca^{2+} 处理能够抑制果实乙烯的生成,延缓果实的成熟衰老进程,这在苹果^[6]、梨^[23]等果实上都得到了证明。在无菌培养的条件下,外源 Ca^{2+} 溶液处理番茄果实圆片同样能够抑制果实圆片的乙烯生成,延缓果实的成熟^[11,25]。本研究表明,钙调素抑制剂能够抵消 Ca^{2+} 对番茄果实圆片乙烯生成的抑制作用,且 W7 的作用比 W5 更明显(图 1),Njoroge^[7]在对绿熟期番茄整果的研究中也发现 CaCl_2 + W7 处理的果实乙烯生成量明显的高于 CaCl_2 单独处理,这与本研究结果相同。 Ca^{2+} 处理抑制绿熟期番茄果实 LeACO1, NR, LeERF2 基因的表达,而钙调素抑制剂能够抵消 Ca^{2+} 对 LeACO1, NR, LeERF2 基因表达的抑制作用(图 2~5)。LeACO1 是调控番茄果实跃变乙烯合成的主要基因^[15], NR, LeERF2 是实现乙烯生理作用的信号转导途径中的关键组份^[13,26],由此可见 Ca^{2+} 可能是通过与 CaM

相互作用来抑制乙烯生物合成及其生理作用。LeACO1, NR, LeERF2 在一定时期内,随果实成熟进程的进展表达量逐渐增加^[13,26],而 NR 发生突变或者抑制 LeACO1 基因的表达则番茄果实不能正常成熟^[27,28],因此这些基因与番茄果实成熟密切相关。由此推断外源 Ca^{2+} 可能是通过与钙调素相互作用抑制乙烯生理作用相关基因的正常表达,从而抑制了果实成熟衰老。

参考文献:

- [1] Paliyath G, Poovaiah B W. Calmodulin inhibitor in senescence apples and its physiological and pharmacological significance[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 2065 - 2069.
- [2] 吴有梅, 刘 愚. 番茄果实成熟过程中钙调素含量变化及其与乙烯合成的关系[J]. 植物生理学报, 1990, 16: 245 - 250.
- [3] 宗 会, 胡文玉. 涂膜苹果在贮藏期间钙信使组分的变化[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 187 - 188.
- [4] 肖 静, 杨洪强. 钙延缓果实衰老软化的生理机制[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 380 - 384.
- [5] Burns J K, Evensen K B. Ca^{2+} effects on ethylene, carbon dioxide and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity [J]. Physiologia Plantarum, 1986, 66: 609 - 615.
- [6] 关军锋, 束怀瑞, 黄天栋. 钙对‘型红星’苹果乙烯生成的作用[J]. 园艺学报, 1991, 18: 205 - 209.
- [7] Njoroge C K, Kerbel E L, Briskin D P. Effect of calcium and calmodulin antagonists on ethylene biosynthesis in tomato fruits[J]. J Sci Food Agr, 1998, 76: 209 - 214.
- [8] Tanaka K, Yokota M, Ishikawa-Takano Y, et al. Role of calcium in fruit involved in ethylene production[J]. ISHS Acta Horticulturae, 1998. 464.
- [8] Campbell A D, Huysamer M, Stotz H U, et al. Comparison of ripening processes in intact tomato fruit and pericarp discs[J]. Plant Physiol, 1990, 194: 1582 - 1589.
- [9] ZHANG J S, GU J, CHEN S Y. A gene encoding a truncated large subunit of Rubisco is transcribed and salt-inducible in rice[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 361 - 366.
- [10] 石 英. 胁迫对 LeACSs 与乙烯信号转导核内组份基因表达的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2002.
- [11] 王文雅. 钙对番茄乙烯生物合成和信号转导的调控机理及果实软化的影响[D]. 北京: 中国农业大学. 2002.
- [12] Zhang Y P, Zhu B Z, Luo Y B. Relationship between

- Ca²⁺ and plant ethylene response[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44: 422 - 426.
- [13] 蔚变云. 番茄果实乙烯信号转导组分 EREBPs 基因克隆和表达研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2002.
- [14] Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, *et al.* Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1295 - 1305.
- [15] Barry C S, Tous Liop M I. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene syntheses in tomato[J]. *Plant Physiol*, 2000, 123: 979 - 986.
- [16] Philip J W. Recent advances in fruit development and ripening: an overview[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1995 - 2000.
- [17] Saltveit M E. Effect of alcohols and their interaction with ethylene on the ripening of epidermal pericarp discs of tomato fruit[J]. *Plant Physiol*, 1989, 90: 167 - 174.
- [18] Ben-Arie R, Mignani H L, Greve C, *et al.* Regulation of the ripening of tomato pericarp discs by GA₃ and divalent cations[J]. *Physiol Plant*, 1985, 93: 99 - 107.
- [19] Sozzi G O, Greve C, Prody G A, *et al.* Gibberellic Acid, synthetic auxins and ethylene differentially modulate α -L-Arabinofuranosidase activities in antisense1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1330 - 1340.
- [20] 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [21] 王朝晖, 孙大业. 植物钙调素研究进展[J]. *植物学通报*, 1997, 14(1): 1 - 7.
- [22] Reddy A S. Calcium: silver bullet in signaling[J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 381 - 404.
- [23] Tianbao Y, Poovaiah B W. A Calmodulin-binding/CGCG Box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants[J]. *J Bio Chem*, 2002, 277(47): 45049 - 45058.
- [24] Isabel Lara. Miquel Vendrell ACC Oxidase by cold storage on Passe-Crassane pears: Effect of calcium treatment[J]. *J Sci Food Agr*, 1998, 76: 421 - 426.
- [25] Ben-Arie R, Mignani I, Greve L C, *et al.* Regulation of the ripening of tomato pericarp discs by GA₃ and divalent cations[J]. *Physiol plant*, 1995, 93: 99 - 107.
- [26] Alexander L, Grierson D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 2039 - 2055.
- [27] Michael B L, Yen H C, Giovannoni J J, *et al.* The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 521 - 530.
- [28] Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants[J]. *Nature*, 1990, 346: 284 - 287.