

小麦高温锻炼过程中钙调素含量的变化

李晓芝¹, 周人纲¹, 樊志和¹, 白娟²

(1 河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 河北 石家庄 050051;

2 河北师范大学生物系, 河北 石家庄 050016)

摘要: 研究了小麦悬浮培养细胞及小麦幼苗高温锻炼过程中钙调素含量的变化规律。结果表明, 小麦悬浮培养细胞或幼苗经 34 °C 锻炼均可引起钙调素的积累, Ca²⁺ 螯合剂 EGTA 对钙调素的积累具有抑制作用。

关键词: 小麦; 钙调素; 高温锻炼

中图分类号: S512.101 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2000)03-0020-04

当环境温度升高时, 会引起植物体内编码热激蛋白(HSPs)的HSmRNA转录和翻译的改变, 从而使HSPs合成的数目及数量增加, 有助于植物获得耐热性以抵御更高温度的伤害^[1,2]。但关于植物对外界高温信号的感受、接收、传递和对其作出一系列反应的过程人们却知之甚少。近年来, Ca²⁺ 作为第二信使受到广泛关注, 钙调素(CaM)作为Ca²⁺信号的受体蛋白, 在Ca²⁺-CaM信号系统中起着重要作用。研究发现Ca²⁺参与感受和调节植物对许多环境胁迫的反应, 如盐渍^[3,4]、触摸^[5]、低温^[5,6]、高温^[7]等, 但对于高温与CaM的关系则研究较少。本研究以小麦悬浮培养细胞及幼苗为材料, 研究了小麦高温锻炼过程中CaM含量的变化。

1 材料和方法

1.1 试验材料

小麦(品种为丰抗8)悬浮培养细胞, 7 d 继代一次, 取继代后4 d的细胞作为试验材料。

小麦(品种为90-80)种子分别于10 mmol/L CaCl₂ 或2 mmol/L EGTA 溶液中浸泡过夜, 排列于铺有3层滤纸的培养皿中, 22 °C暗培养3 d。

1.2 温度处理

细胞置于所需要温度的水浴摇床上处理一定时间, 耐热性测定时, 再将细胞转入50 °C水浴处理1 h。

幼苗置于34 °C生长箱中进行热锻炼, 锻炼过程中保持箱内湿度恒定。

1.3 耐热性测定

处理后的细胞于沙芯漏斗中抽去培养基, 再用相同温度的蒸馏水冲洗, 然后称取0.1 g(3个重复), 按Chen^[8]的方法(TTC法)测定细胞活力, 用50 °C处理后细胞相对活力表示细胞的

收稿日期: 1999-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770075); 河北省自然科学基金资助项目(397369)

作者简介: 李晓芝(1961-), 女, 副研究员, 理学学士, 主要从事植物生理生化的研究工作。

耐热性。

1.4 CaM 含量的测定

细胞于沙芯漏斗中抽去培养基, 用相同温度的无离子水洗涤, 称取 1 g (2 份), 在液氮保护下研磨, 再加入 2 mL 提取液 (内含 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L PMSF, 20 mmol/L NaHSO₃, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0), 超声破碎。一份直接于 10,000 r/min 离心 30 min, 上清液用于可溶性蛋白测定; 另一份先于 90 °C 水浴中处理 3 min, 冷却后再于 10,000 r/min 离心 30 min, 用于 CaM 测定, 并同时测定蛋白含量。CaM 的定量用 ELISA 方法^[9]。

小麦幼苗剪下来后吸干水分, 称取 1.5 g, 无离子水冲洗后吸干水分, 在液氮保护下研磨, 再加入等体积的提取液, 其他处理同悬浮培养细胞。

2 结果与分析

2.1 温度对悬浮培养细胞耐热性的影响

通过对继代后培养过程中细胞活力的测定, 发现细胞于继代后 4 d 活力较高, 故选择此时

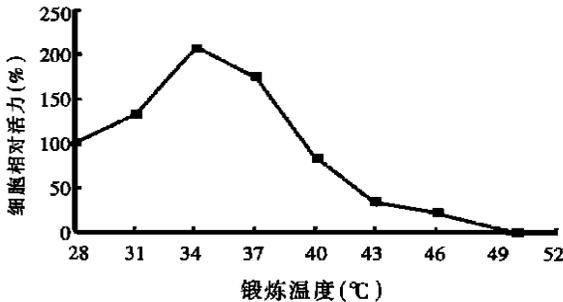


图 1 不同锻炼温度对小麦悬浮培养细胞耐热性的影响

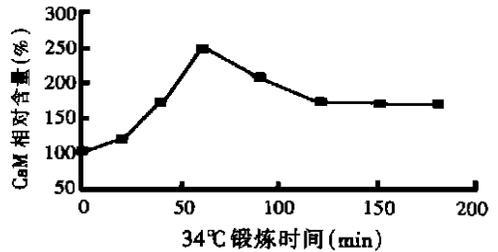


图 2 小麦悬浮培养细胞 34 °C 锻炼与 CaM 含量的关系

的细胞用于试验。对不同温度锻炼后的细胞再于 50 °C 下处理 1 h, 用 TTC 法进行活力测定。结果 (图 1) 表明, 当锻炼温度低于 34 °C 时, 随着温度的提高, 细胞活力增强; 当温度高于 34 °C 时, 随着处理温度的提高, 细胞活力降低; 细胞经 34 °C 锻炼活力最高。也就是说细胞经 34 °C 锻炼可获得最高耐热性。故后面的试验均在 34 °C 进行。

2.2 34 °C 处理对悬浮培养细胞 CaM 含量的影响

研究结果 (图 2) 显示, 34 °C 处理可引起 CaM 的积累。随着处理时间的延长, CaM 含量先呈上升趋势, 处理 1 h 达最高峰, 其含量

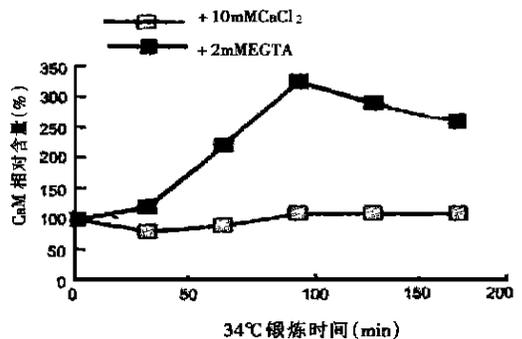


图 3 小麦幼苗 34 °C 锻炼与 CaM 含量的关系

是对照的 249%。之后随着处理时间的延长 CaM 含量下降。由于处理过程中细胞内的可溶性蛋白含量未发生明显变化,故图中所示 CaM 含量的增加确为 CaM 的积累。

2.3 34 °C处理对幼苗 CaM 含量的影响

根据周人纲等^[10]的工作,34 °C亦为小麦幼苗的最佳锻炼温度。测定结果(图3)表明,在试验范围内,CaM 含量均随着34 °C处理时间的延长而增加,但增加的程度却有很大不同,Ca-Cl₂处理的幼苗经34 °C锻炼 CaM 含量有较大幅度的提高,而经 EGTA 处理的幼苗中 CaM 含量变化很小;两种处理的 CaM 含量均于34 °C锻炼 90 min 时达到最大值。这一结果进一步证实了小麦热锻炼过程伴随着 CaM 的积累,且 CaM 的积累受 Ca²⁺ 的影响。

3 讨论

近年来的研究表明,Ca²⁺ 不仅是植物生长所需的营养元素,也是重要的胞内信使,参与调节许多不同的生理过程,CaM 在 Ca²⁺ 信使系统中扮演着重要角色^[7, 11~ 13]。李卫等^[6]研究了 Ca²⁺ 与 CaM 对柑橘原生质体抗冻性的影响,结果表明 Murcott 橘橙低温锻炼过程伴随着 CaM 的积累,Ca²⁺ 螯合剂 EGTA 及 CaM 拮抗剂 TFP 明显抑制原生质体抗冻力的表达。Gong 等^[14]对玉米幼苗耐热性获得的研究也证明,耐热性的获得需要胞外 Ca²⁺ 进入胞内,以及胞内 CaM 的调控。本研究结果表明,小麦高温锻炼过程亦伴随着 CaM 的积累;且 CaM 的积累受 Ca²⁺ 浓度的影响。这与前人的研究结果是一致的。34 °C不仅是小麦的最佳锻炼温度,在此温度锻炼可获得最高耐热性,它也是小麦 HSPs 的最佳诱导温度。小麦幼苗经 34 °C 处理后可产生以 70, 54, 26, 15~ 17KD 为主的十几种 HSPs^[15]。孙旭彤等^[16]进行了 HSP70 与 CaM 结合的研究,发现在 Ca²⁺ 存在下 HSP70 可以与 CaM 结合。Mosser 等^[17]的研究表明,Ca²⁺ 在热激基因转录调节中起着重要作用。这些结果可能暗示着 Ca²⁺, CaM, HSPs 及耐热性之间存在着某种内在的联系。Ca²⁺ - CaM 信号系统可能通过 HSP70 调节热激反应。

参考文献:

- [1] Howarth C, Ougham H J. Gene expression under temperature stress [J]. *New Phytol*, 1993, 125: 1- 26.
- [2] Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants [J]. *J Exp Bot*, 1996, 47: 325- 338.
- [3] Lunch J, Polito V S, Lauchli A. Salinity stress increases cytoplasmic Ca²⁺ activity in maize root protoplasts [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1271- 1274.
- [4] Bush D S. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells [J]. *Planta*, 1996, 199: 89- 99.
- [5] Knight M R, Campbell A K, Smith S M, *et al*. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium [J]. *Nature*, 1991, 352: 524- 526.
- [6] 李 卫, 孙中海, 章文才, 等. 钙与钙调素对柑橘原生质体抗冻性的影响 [J]. *植物生理学报*, 1997, 23 (3): 262- 266.
- [7] Gong M, Arnold H, Knight M R, *et al*. Heat shock induced changes in intracellular Ca²⁺ level in tobacco

- seedlings in relation to thermotolerance[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116: 429– 437.
- [8] Chen T H H, Lawrence V G. Abscisic acid induced freezing resistance in cultured plant[J]. *Plant Physiol*, 1983, 73: 71– 75.
- [9] 赵升皓, 于宏林, 张明志, 等. 钙调素的酶联免疫吸附测定法[J]. *徐州医学院学报*, 1988, (8): 54.
- [10] 周人纲, 樊志和, 李晓芝, 等. 高温锻炼对小麦细胞膜热稳定性的影响[J]. *华北农学报*, 1993, 8(3): 33– 37.
- [11] Roberts D M. Calcium modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 1992, 3: 375– 414.
- [12] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling[J]. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95– 122.
- [13] Webb A A R, Mcainsh M R, Taylor J E, *et al*. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants[J]. *Adv Bot Res*, 1996, 22: 45– 96.
- [14] Gong M, Li Y J, Dai X, *et al*. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat shock induced thermotolerance in maize seedlings[J]. *J Plant Physiol*, 1997, 150: 615– 621.
- [15] 李晓芝, 周人纲, 樊志和, 等. 小麦热激蛋白的诱导合成[J]. *核农学报*, 1995, 9(1): 51– 54.
- [16] 孙旭彤, 周人纲, 汤文强, 等. 玉米细胞质 HSC70: 一种钙调素结合蛋白[J]. *植物学报*, 1998, 40(3): 288– 290.
- [17] Mosser D D, Paul T K, Kevin D S, *et al*. In vitro activation of heat shock transcription factor DNA Binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 3748– 3752.

A Study on Relationship Between Heat Acclimation and Calmodulin Level in Wheat

LI Xiaozhi¹, ZHOU Ren gang¹, FAN Zhir he¹, BAI Juan²

(1 Institute of Agror Physics, Plant Physiology and Biochemistry, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang Hebei 050051, China;

2 Biology Department, Hebei Normal University, Shijiazhuang Hebei 050016, China)

Abstract: The calmodulin level was measured in wheat cultured cells and wheat seedlings during heat acclimation at 34 °C. The results showed that the CaM level significantly increased during heat acclimation while Ca²⁺ was presented. And the Ca²⁺ chelator EGTA prevented the CaM accumulation.

Key words: Wheat; Calmodulin; Heat acclimation