

KT 和 Ca^{2+} 对绿豆下胚轴原生质体的体积和 CaM 含量的影响

李德红 张瑞凤* 潘瑞炽 王小菁**

(华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要: 以黄化绿豆幼苗下胚轴原生质体为材料, 探讨钙信使系统在 KT 诱导原生质体体积变化中的作用。1 $\mu\text{mol/L}$ KT 可诱导含钙培养液中绿豆下胚轴原生质体膨大, 处理后 30 min 达到最大体积。 Ca^{2+} 通道阻断剂 Verapamil、 Ca^{2+} 通道竞争性抑制剂 LaCl_3 和钙调素拮抗剂 TFP、CPZ 可明显抑制 KT 诱导的原生质体膨大。另一方面, 无论是 KT 处理还是对照(CaCl_2 单独处理), 原生质体内 CaM 含量均在处理后 30 min 时达到峰值, 前者是后者的 5 倍。在 KT+ CaCl_2 处理液中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ Verapamil、50 $\mu\text{mol/L}$ LaCl_3 、5 $\mu\text{mol/L}$ TFP 或 CPZ 后原生质体内 CaM 含量都大大降低。以上结果表明, CaM 可能与 Ca^{2+} 共同参与 KT 的信号传递。

关键词: 激动素; 钙; 钙调素; 原生质体

中图分类号: Q942.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)02-153-04

Effects of KT and Ca^{2+} on the Change in Volume of Protoplasts and CaM Content in Hypocotyl of Etiolated Mung Bean Seedlings

LI De-hong ZHANG Rui-feng* PAN Rui-chi WANG Xiao-jing**

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The role of calcium ion in kinetin (KT) signal transduction was studied with etiolated mung bean (*Phaseolus radiatus* L.) hypocotyl protoplasts. The volume of protoplasts maintained at a constant osmotic potential at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ began to swell 10 minutes later when treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ KT in the present of CaCl_2 , and reached their maximum at 30 minutes, then declined to the same level as the control one (CaCl_2 only) at 60 minutes. The swelling of protoplasts induced by KT could be significantly inhibited by Verapamil (Ca^{2+} channel blocker) or LaCl_3 (Ca^{2+} channel competitive inhibitor) respectively. Calmodulin antagonists TFP, CPZ and W₇ could obviously inhibit protoplasts swelling induced by KT. CaM levels in protoplasts reached their peaks at 30 minutes whether treated with or without KT, the CaM content of the treated one being about five times more than that in treatment without KT. However, when KT and CaCl_2 solutions were added with 5 $\mu\text{mol/L}$ CPZ, TFP or 0.5 $\mu\text{mol/L}$ W₇, CaM level in protoplasts declined greatly. It is suggested that calcium acts as the second messenger in KT-induced swelling of protoplasts in this system and Ca^{2+} -CaM may play an important role. The

present study did not exclude the possibility of involvement of other cellular signaling system.

Key words: KT; Calcium; CaM; Protoplast

近年来, 已有大量资料证明钙和钙调素参与植物代谢和生长发育^[1-6]。钙对植物激素的功能有强烈的修饰作用。Elliot 曾经推论通过 Ca^{2+} -CaM 调节细胞内功能是植物激素的一种统一作用方式^[5]。本文

收稿日期: 2002-07-11 接受日期: 2002-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(39970079); 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[1998]679号); 优秀年轻教师资助计划项目资助

* 现在工作地址: 广东省环境保护局, 广州 510045

** 通讯联系人 Corresponding author

缩写 Abbreviation: KT; 激动素 Kinetin; CaM; 钙调素 Calmodulin; TFP; 三氟啦嗪 Trifluoperazine; CPZ; 氯丙嗪 Chlorpromazine; MES; 2-N-吗啉乙烷磺酸 2-(N-morpholino) ethane sulphonic acid

探讨 KT 在原生质体体积变化中的作用以及 CaM 含量变化的关系, 这对研究 Ca^{2+} -CaM 参与植物激素作用的调控是很有意义的。

1 材料和方法

原生质体制备 采用我们先前的方法^[7]培养绿豆(*Phaseolus radiatus* L.)黄化幼苗、分离和纯化原生质体。

原生质体体积测定 将原生质体分别悬浮于基本培养液(含 9%甘露醇 +5 mmol/L MES, pH 6.0)中, 调整原生质体的密度到 10^5 - 5×10^5 个 ml^{-1} 。然后加入 CaCl_2 (250 $\mu\text{mol/L}$) 或 / 和 KT (1 $\mu\text{mol/L}$), 或进一步加入其它试剂, 于黑暗中保温一定时间后参照 Bossen 等的方法^[9], 将原生质体制片, 显微摄影。以测微尺测量每张制片中至少 100 个原生质体的直径, 计算其体积, 每个处理最少重复三次。

原生质体内 CaM 含量的测定 按上述方法提取、纯化的原生质体, 在含或不含 KT 的含钙培养液中保温一定时间后, 置于液氮中终止反应并破碎原生质体, 然后保存于 -20°C 冰箱中备用。参照赵升浩等^[9]的方法用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定 CaM 含量。标准植物 CaM 由河北师范大学生物系提供。

蛋白质含量的测定 采用考马斯兰 G-250 法^[9]。

2 结果和分析

2.1 KT 诱导原生质体膨大的时间进程和 CaM 含量的动态变化

在含钙培养液中加或不加 1 $\mu\text{mol/L}$ KT 处理原生质体, 黑暗中分别保温 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 min 后, 测定其体积, 结果如图 1A 所示。不加 KT 的含钙培养液中的原生质体体积变化不大, 处理后 0-30 min 略减小, 30-60 min 体积慢慢回复。而加 KT 的原生质体在处理 10 min 后可观察到膨大现象, 随着时间推移, 原生质体逐渐膨大, 30 min 时达到最大体积, 随后膨大程度减弱。

另一方面, 无论是 KT+ CaCl_2 处理还是对照(CaCl_2) 的原生质体, 都在处理后 30 min 时出现 CaM 峰值(图 1B)。在试验的 60 min 内, 加 KT 后, 原生质体 CaM 含量比对照显著升高, 30 min 后, CaM 含量远远高于对照的水平, 几乎是它的 5 倍。原生质体体积变化和 CaM 含量都在处理后 30 min 时变化最大, 这暗示体积变化可能与 CaM 含量变化存在一定联系。

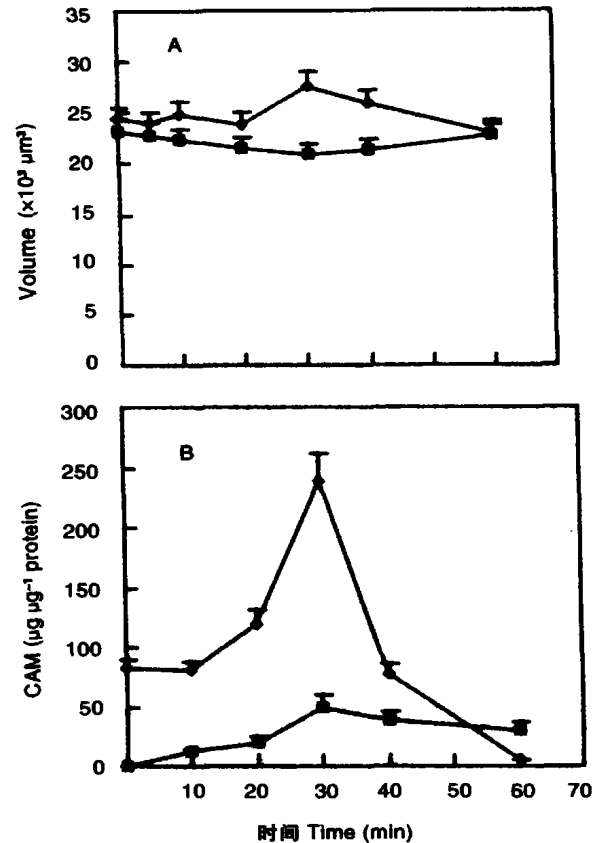


图 1 KT 诱导原生质体膨大(A)和 CaM 含量变化(B)的时间进程
Fig. 1 Time course of KT-induced changes of protoplast volume (A) and CaM content (B)

Protoplasts were maintained in darkness at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 0, 10, 20, 30, 40 or 60 min respectively. CaCl_2 and KT were 0.25 mmol/L and 1 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Values are the means of 3 replicates per treatment
□ CaCl_2 ◇ KT+ CaCl_2

2.2 钙通道阻断剂 Verapamil 和钙通道竞争性抑制剂 LaCl_3 对原生质体体积和 CaM 含量的影响

为了了解膨大是否需要胞外 Ca^{2+} 进入胞内这一过程, 我们采用了钙通道阻断剂 Verapamil 和钙通道竞争性抑制剂 LaCl_3 处理原生质体。Verapamil 是一种钙通道阻断剂, 能阻断信使的产生^[10]。在含钙培养液中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ Verapamil, 发现 KT 使原生质体膨大的效应从 17.11% 下降到 7.09%, CaM 含量也急剧下降, 甚至比对照的含量还低。 La^{3+} 不能进入植物细胞内, 它在质膜的外部抑制 Ca^{2+} 的作用或更专一地抑制 Ca^{2+} 内流^[10]。在含钙培养液中加 50 $\mu\text{mol/L}$ LaCl_3 后, LaCl_3 抑制原生质体膨大, 但对 CaM 含量的抑制比 Verapamil 弱得多(表 1)。可见, 减少 Ca^{2+} 进入胞内可抑制原生质体的膨大, 同时也降低钙调素含量。这进一步表明原生质体膨大与 CaM 含量之间的关联。

表1 Verapamil和LaCl₃对原生质体体积和CaM含量的影响
Table 1 Effects of Verapamil and LaCl₃ on protoplast volume and CaM content

处理 Treatment	体积 Volume (×10 ³ μm ³)	钙调素 CaM (mg g ⁻¹ Protein)
CaCl ₂ (Control)	18.06±0.22	53.50±12.36
KT	20.85±1.15	45.40±4.90
CaCl ₂ +KT	21.15±0.69	215.88±8.70
CaCl ₂ +KT+5 μmol/L Verapamil	19.34±0.87	17.89±6.30
CaCl ₂ +KT+50 μmol/L LaCl ₃	17.50±0.35	135±8.90

2.3 钙调素拮抗剂对原生质体膨大和钙调素含量的影响

为了进一步了解KT诱导原生质体膨大与CaM含量之间的关系,我们采用钙调素拮抗剂CPZ、TFP、W₇分别与KT配合处理含钙培养液中的原生质体。如表2所示,CaM拮抗剂明显抑制原生质体膨大的同时,也使原生质体内CaM水平急剧下降,尤以CPZ和TFP对CaM含量的降低程度为甚。该结果表明,当CaM含量减少或活性降低时KT诱导的膨大受抑制,从而进一步表明原生质体的膨大与其CaM含量有关。

表2 钙调素拮抗剂对原生质体体积和钙调素含量的影响
Table 2 Effects of calmodulin antagonists on protoplast volume and CaM content

处理 Treatment	体积 Volume (×10 ³ μm ³)	钙调素 CaM (mg g ⁻¹ protein)
CaCl ₂ (Control)	17.22±0.32	41.50±8.91
KT	19.87±0.56	185.50±12.13
CaCl ₂ +KT	21.13±0.54	243.75±10.18
CaCl ₂ +KT+5 μmol/LCPZ	17.85±0.67	12.50±5.61
CaCl ₂ +KT+5 μmol/LTFP	19.62±0.64	38.60±9.72
CaCl ₂ +KT+0.5 μmol/LW ₇	19.13±1.82	160.12±10.21

3 讨论

近年来,许多研究都发现激素等外界信号可使原生质体膨大,并伴随着Ca²⁺内流^[2,3,6,11,12],本试验为此提供了更进一步的证据。原生质体膨大的原因主要是通过吸收胞外的溶质或分解胞内淀粉及增加CO₂固定物等来降低细胞内的渗透势^[13]。对于本实验系统而言,后两个原因应该可以排除。许多研究发现,依赖于细胞分裂素的细胞膨大主要是离子运输发生变化引起的^[14-16]。在本实验中,KT信号可

能使质膜打开Ca²⁺通道,同时也可能打开其它离子通道(如Cl⁻、K⁺通道),从而使质膜吸收阳离子,引起渗透势变化,导致吸水膨大。当用钙通道拮抗剂Verapamil、钙通道竞争性抑制剂La³⁺等试剂阻碍或减少Ca²⁺进入原生质体,就会减轻膨大效应。另有研究证实Ca²⁺通道抑制剂Verapamil和Bepridil抑制⁴⁵Ca²⁺流入胡萝卜原生质体^[7]。La³⁺通过细胞膜上的Ca²⁺通道抑制Ca²⁺内流到苦草的叶肉细胞原生质体^[8]。我们在先前的试验中发现IAA和6-BA^[2,3]对原生质体的影响也依赖于Ca²⁺内流,Verapamil和LaCl₃均能抑制这一过程,使原生质体体积膨大受阻。由此我们推论,KT诱导的原生质体的膨大可能也需要Ca²⁺进入胞内。

本试验还发现KT诱导的原生质体的膨大与原生质体内CaM含量有关。一般认为CaM的作用方式是与Ca²⁺结合形成活化的Ca²⁺-CaM复合物激活靶酶^[1,19,20]。本试验结果显示,无论CaCl₂处理(对照)还是KT+CaCl₂处理,原生质体内CaM含量都在30 min出现一个峰值,此时KT+CaCl₂处理的CaM含量是对照的5倍左右,原生质体的体积也相应最大。这与在IAA、6-BA试验中观察到的现象十分相似^[2,3]。

综上所述,KT所诱导的原生质体的膨大可能是通过打开质膜上的Ca²⁺通道或胞内贮钙体释放Ca²⁺引起的胞质内Ca²⁺浓度升高而实现的。胞内Ca²⁺浓度的变化可被CaM感受,郝鲁宁和余叔文认为CaM只有与Ca²⁺结合才有生理活性^[20]。因此,无论用降低胞内Ca²⁺浓度的钙通道拮抗剂Verapamil、钙通道竞争性抑制剂La³⁺或者减低胞内CaM含量的钙调素拮抗剂TFP、CPZ、W₇等都可以抑制原生质体的膨大。这说明,Ca²⁺可能与CaM结合在一起参与了KT诱导原生质体膨大的过程。

此外,有报道指出,脱壁酶裂解产生的植物细胞壁片断,能以信号分子的方式与细胞膜上蛋白受体结合,或改变膜脂的结构,引起细胞膜通透性的改变,从而引起一系列细胞生理过程的改变^[21]。本试验中对照的原生质体体积在60 min内有一个体积先略变小,然后慢慢回复的过程,这是否与脱壁酶及脱壁操作有关尚待证实。

参考文献

- [1] Poovaiah B W. Molecular and cellular aspects of calcium action in plants [J]. HortSci, 1988, 23(2):267-271.
- [2] Li D H(李德红), Wang X J(王小菁), Pan R C(潘瑞炽). Role of

- calcium in 6-BA-induced swelling of protoplasts isolated from hypocotyl in etiolated mung bean seedlings [J]. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 1998, 31(2):187-193. (in Chinese)
- [3] Li D H (李德红), Wang X J (王小菁), Pan R C (潘瑞焱). The role of calcium in IAA-induced swelling of protoplasts isolated from hypocotyl of etiolated mung bean seedlings [J]. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 1999, 32(1):55-61. (in Chinese)
- [4] Bossen M E, Dassen H H A, Kendrick R E, et al. The role of calcium ions in phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts [J]. *Planta*, 1988, 174: 94-100.
- [5] Elliot D C, Batchelor S M, Cassar P A, et al. Camodulin-binding drugs affect response to cytokinin, auxin and gibberellic acid [J]. *Plant Physiol*, 1983, 72:219-224.
- [6] Roux S J, Wayne R O, Datta N. Role of calcium ions in phytochrome response: an update [J]. *Physiol Plant*, 1986, 66: 344-348.
- [7] Long C (龙程), Wang X J (王小菁), Pan R C (潘瑞焱). The role of calcium ions in red light-induced swelling of mung bean protoplasts [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1995, 40(3): 248-251. (in Chinese)
- [8] Zhao S H (赵升浩), Yu H L (于宏林), Zhang M Z (张明志), et al. Calmodulin enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Xuzhou Med Coll* (徐州医学院学报), 1988, 8(1):54-58. (in Chinese)
- [9] Zhang Z L (张志良). *Experimental Instruct of Plant Physiology* [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1992. 183-184. (in Chinese)
- [10] Lehtonen J. The significance of Ca^{2+} in the morphogenesis of *Microsteris* studied with EGTA, Verapamil, $LaCl_3$ and calcium ionophore A23187 [J]. *Plant Sci Lett*, 1984, 33:53-60.
- [11] Reiss C, Beale S I. External calcium requirements for light induction of chlorophyll accumulation and its enhancement by red light and cytokinin pretreatment in excised etiolated cucumber cotyledons [J]. *Planta*, 1995, 196:635-641.
- [12] Chung C H, Lim S U, Song P S, et al. Swelling of etiolated oat protoplasts induced by phytochrome, AMP and gibberellic acid: a kinetic study [J]. *Plant Cell Physiol*, 1988, 29:855-860.
- [13] Swain S M, Olszewski N E. Genetic analysis of gibberelin signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:11-17.
- [14] Ilan I, Gilad T, Reinhold L. Specific effects of kinetin on the uptake of monovalent cations by sunflower cotyledons [J]. *Physiol Plant*, 1971, 24:337-347.
- [15] Marrè E, Lado P, Rasi-Caldogno F, et al. Transmembrane potential increases induced by auxin, benzyladenine and fusococin, correlation with proton extrusion and cell enlargement [J]. *Plant Sci Lett*, 1974, 2:257-265.
- [16] Sastry K S K, Udayakumar M, Rao S. Benzyladenine-induced uptake of potassium and sodium in excised cucumber cotyledons [J]. *Curr Sci*, 1973, 42:830.
- [17] Graziana A, Fosset M, Ranjeva R, et al. Ca^{2+} channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca^{2+} enter into protoplasts [J]. *Biochemistry*, 1988, 27:764-768.
- [18] Takagi S, Nagai R. Light-affected Ca^{2+} fluxes in protoplasts from *Vallisneria* mesophyll cell [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88:228-232.
- [19] Sun D Y (孙大业). Calmodulin and its role in plants [J]. *Plant Physiol Com* (植物生理学通讯), 1984, 20(6):13-19. (in Chinese)
- [20] Hao L N (郝鲁宁), Yu S W (余叔文). Plant intracellular messengers and their functions [A]. In: Yu S W. *Plant Physiology and Molecular Biology* [M]. Beijing: Science Press, 1992. 123-140. (in Chinese)
- [21] Qi F J (齐放军), Wang J S (王金生), He C Y (何晨阳), et al. Improving of plant protoplast culture technique considering plant defense responses [J]. *Plant Physiol Com* (植物生理学通讯), 1996, 32(6):401-405. (in Chinese)