

# 钙对苹果果实钙调蛋白含量和 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及其基因表达的影响

孙静文, 周卫\*, 梁国庆, 王秀斌

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部作物营养与施肥重点开放实验室, 北京 100081)

**摘要:** 研究不同浓度钙(0、1 和 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mmol/L EGTA)对苹果果实钙调蛋白(CaM)含量和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及其基因表达的影响。利用同源克隆方法分离 *CaM* 和 *Ca^{2+}*-ATPase 基因, 采用荧光定量 PCR 方法研究它们表达特征。结果表明, 果实切片外源补钙, 可溶性  $\text{Ca}^{2+}$  及 CaM 含量在高钙处理 12 h 达到高峰; 高钙处理 12 h 质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性显著增加, 与胞内 CaM 含量增加时间一致; 高钙处理 24 h 液泡膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性显著增加; 随着质膜和液泡膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性显著增加, 可溶性  $\text{Ca}^{2+}$  含量在加钙处理 48 h 显著下降。研究基因表达发现, 加钙处理 6 h 苹果 *CaM* 基因的表达量显著增加; 加钙处理 12 h 苹果 *Ca^{2+}*-ATPase 基因的表达量显著增加, 与 CaM 含量及质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性变化一致。果实缺钙处理显著增加 *CaM* 基因表达量, 而苹果 *Ca^{2+}*-ATPase 基因的表达量没有显著变化。上述研究表明, 苹果补钙可以提高细胞内可溶性  $\text{Ca}^{2+}$  和 CaM 含量以及 *CaM* 基因的表达量, 有效启动钙信使系统; 质膜及液泡膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 是调控胞内  $\text{Ca}^{2+}$  关键的酶, 通过提高质膜及液泡膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性及 *Ca^{2+}*-ATPase 基因的表达量, 维持胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的稳态水平。

**关键词:** 钙; 钙调蛋白;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; 基因表达; 荧光定量 PCR; 苹果

中图分类号: S661.1.601

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2011)02-0425-08

## Effects of calcium on content of calmodulin, activity of $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and their gene expressions in apple (*Malus pumila* Mill.) fruits

SUN Jing-wen, ZHOU Wei\*, LIANG Guo-qing, WANG Xiu-bin

(Institute of Agricultural Resource and Regional Planning, CAAS/Ministry of

Agriculture Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Effects of calcium on calmodulin (CaM) content,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and their gene expressions in apple (*Malus pumila*) fruits were investigated under the hydroponic condition with 0, 1, 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  and 5 mmol/L EGTA. *CaM* and *Ca^{2+}*-ATPase gene were isolated by homologous cloning and their expression patterns were analyzed by real-time PCR. Addition of 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  to the culture solutions with 12 h exposure significantly increased soluble  $\text{Ca}^{2+}$  and CaM contents in apple fruits. With the CaM content increasing, plasma and tonoplast membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities were enhanced after 12 and 24 h Ca exposure respectively, resulting in the decrease in the soluble  $\text{Ca}^{2+}$  content after 48 h Ca exposure. In molecular level, the abundances of *CaM* and *Ca^{2+}*-ATPase genes were up-regulated after 6 h and 12 h Ca exposure, respectively, in accordance with change of the CaM content and plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. Addition of 5 mmol/L EGTA to the culture solutions induced up-regulated the expression of the *CaM* gene, however, did not markedly change the expression of the *Ca^{2+}*-ATPase gene. It was concluded that external calcium might increase soluble  $\text{Ca}^{2+}$  and CaM contents and the expression of the *CaM* gene to stimulate an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin signaling system. Plasma and tonoplast membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase are of major physiological importance to expel  $\text{Ca}^{2+}$  from eukaryotic cells and to maintain

收稿日期: 2010-06-22

接受日期: 2010-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771250)资助。

作者简介: 孙静文(1977—), 男, 辽宁抚顺人, 博士, 主要从事养植物营养分子生理方面的研究。E-mail: syauman@163.com

\* 通讯作者 Tel: 010-82108671, E-mail: wzhou@caas.ac.cn

overall  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by enhancing their activities and gene expression.

**Key words:** calcium; calmodulin;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; gene expression; real-time PCR; apple

苹果果实缺钙,引发生理失调,苹果苦痘病、水心病就是典型的在贮藏期间由缺钙引起的生理失调症<sup>[1-2]</sup>。钙对果实衰老与生理病害的发生有一定的抑制作用<sup>[2-4]</sup>。其重要原因在于钙既是膜的稳定剂,可以维持和保护质膜的结构;钙又可以作为细胞的第二信使,调控许多种重要的生理生化防御反应,维持细胞的正常生理功能<sup>[5-8]</sup>。因此,深入研究钙素对苹果体内钙信使系统的调控机制,对于防治苹果果实生理性病害,实现苹果高产优质具有重要意义。

细胞钙信使(Calcium messenger)组分主要包括  $\text{Ca}^{2+}$ 、钙调蛋白(Calmodulin, CaM)和膜系统主动运输钙的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase<sup>[7-10]</sup>。钙信使可以直接参与苹果果实的生理失调过程。正常条件下胞质必须保持极低的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度( $10^{-7} \sim 10^{-6}$  mol/L),但在环境胁迫或生理失调下,胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加,这些  $\text{Ca}^{2+}$  可与 CaM 结合,参与某些酶促生化反应;而在完成酶促反应后,胞质高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  主要通过质膜、液泡膜、内质网膜和线粒体膜上的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 主动将胞质  $\text{Ca}^{2+}$  运往胞外或进入液泡、内质网和线粒体等细胞器,以保持胞质的低  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[11-12]</sup>。苹果贮藏期间钙信使组分中水溶性  $\text{Ca}^{2+}$  增加, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性下降,CaM 在出现峰值后下降<sup>[13]</sup>;苹果果肉质膜上存在  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,正是该酶推动  $\text{Ca}^{2+}$  的主动跨膜运输<sup>[14]</sup>。目前,在拟南芥已克隆到 *CaM* 和 *Ca}^{2+}*-ATPase 基因<sup>[15-16]</sup>,发现拟南芥的 *Ca}^{2+}*-ATPase 基因受到 CaM 的调节<sup>[17]</sup>; *CaM* 基因也已从拟南芥、水稻和烟草中分离,并已证实环境胁迫下 *CaM* 基因表达急剧增加<sup>[18-20]</sup>。

当前大量研究集中在果实缺钙的生理效应<sup>[21-24]</sup>上,但不能从根本上回答为什么出现这些效应,即分子机理很不明确。目前,*CaM* 基因和 *Ca}^{2+}*-ATPase 基因已经从模式植物拟南芥、水稻、烟草中克隆,这为从苹果成功分离这两个基因以及深入研究其表达特征打下基础。因此,本研究以苹果为试验材料,研究钙对苹果果实 CaM 含量及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的影响;利用同源克隆方法从苹果分离 *CaM* 和 *Ca}^{2+}*-ATPase 基因,采用荧光定量 PCR 方法(Real-time PCR)研究这两个基因在分子水平的表达。以期从生理和分子水平深入揭示钙素对苹果体内钙信使系统的调控机制,为农

业生产中防治苹果缺钙生理失调提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验方法

选用红星苹果(*Malus pumila*)成熟果实,进行果实薄片培养。将果肉切成直径约 0.6 cm,厚约 0.2 cm 的圆片,在 25℃ 下用含蔗糖 0.3 mmol/L 的 Tris-HCL 缓冲液培养,每 10 mL 缓冲液放入 30 个圆片。设置以下处理:1)对照,不添加  $\text{CaCl}_2$ ;2)低钙处理,1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ;3)高钙处理,10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ;4)缺钙处理,5 mmol/L EGTA(钙专性螯和剂,降低细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度);分别于处理 6、12、24 和 48 h 后取样,经液氮速冻后放入 -80℃ 冰箱保存,供下一步分析。

### 1.2 测定项目与方法

1.2.1 可溶性  $\text{Ca}^{2+}$  的测定 参照缪颖等<sup>[25]</sup>的方法。称取 1 g 冷冻样品,加 10 mL 双去离子水研磨匀浆后转移入三角瓶,间隔振荡 2 h 后过滤,以双去离子水为对照,硝酸钙溶液制作标准曲线,原子吸收法测定。

1.2.2 钙调蛋白(CaM)的测定 参照罗允等<sup>[26]</sup>的酶联免疫法。称取冷冻样品 1 g,以 1:2 (g:mL) 加入预冷的提取液冰浴研磨,提取液包括:50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.5),1 mmol/L EGTA,150 mmol/L NaCl,0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟,20 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ 。

1.2.3 细胞微囊膜制剂的制备 参照 Thomson<sup>[27]</sup>的方法。取 15g 新鲜果肉,按 1:2 (g:mL) 加提取液冰浴研磨,提取液包括:250 mmol/L 蔗糖,50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8),2 mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ ,5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,10% 甘油,110% PVP,4 mmol/L DTT (使用前加入),1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(使用前加入)。四层纱布过滤,2000 × g 4℃ 冷冻离心 10 min,除去细胞核与叶绿体。将上清液 13000 × g 4℃ 冷冻离心 15 min,沉淀用 5 mL 悬浮液 I [250 mmol/L 蔗糖,2.5 mmol/L Tris-Mes (pH 7.0),1 mmol/L DTT,10% 的甘油,0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟]悬浮后再离心一次,沉淀为线粒体,用 2 mL 悬浮液 I 稀释后 -80℃ 冻存。提取线粒体后的上清液 80000 × g 4℃ 冷冻离心 30 min,沉淀为膜制剂,用 2 mL 悬浮液 I 悬浮后小心铺在 0% ~ 10% ~ 22% ~

30%~45% (W/W) 的蔗糖梯度溶液上面,100000 × g 4℃ 冷冻离心 2 h,10%~22% 间组分为液泡膜微囊制剂,22%~30% 间组分为内质网膜微囊制剂,30%~45% 间组分为细胞质膜微囊制剂。梯度离心样品用注射器吸出后加等体积的悬浮液 II (2 mmol/L Tris-Mes,3 mmol/L  $MgCl_2$ ,1 mmol/L DTT),在 0℃ 下处理所得沉淀 15 min,得到密闭膜微囊制剂。样品用液氮速冻后-80℃ 保存,以供  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性的测定。质膜和液泡膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性的测定参照 Rasi-Caldogno<sup>[28]</sup> 的方法进行。

### 1.3 *CaM* 和 $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的克隆及分析

1.3.1 苹果果肉总 RNA 提取及 cDNA 的合成 采取 TRizol 提取法,TRizol 试剂购自 Invitrogen 公司。具体方法参照 Invitrogen 公司 TRizol 试剂说明书。

以 Adaptor-dT 为引物 (5' - GATTTCTGTC-CGACGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT - 3'),以苹果总 RNA 为模板,进行反转录合成第一链 cDNA。所使用的试剂购自 TAKARA 公司,反应过程完全参照 TAKARA 公司试剂盒说明书。

#### 1.3.2 *CaM* 和 $Ca^{2+}$ -ATPase 基因引物设计及克隆

根据拟南芥、芹菜、烟草、大豆、葡萄 5 种植物 *CaM* 基因的保守序列设计一对简并引物 *CaM*-Up 与 *CaM*-Down 和根据拟南芥、水稻、玉米、大豆、烟草 5 种植物  $Ca^{2+}$ -ATP 基因的保守序列设计一对简并引物 CAP-Up 与 CAP-Down (表 1)。

以合成的苹果 cDNA 为模板,分别用简并引物

*CaM*-Up 与 *CaM*-Down 配对以及 CAP-Up 与 CAP-Down 配对进行 PCR 扩增,克隆 *CaM* 和  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因。采用 Bio-Rad 公司的 MyCycler 型 PCR 仪,PCR 反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,循环 30 次;72℃ 10 min。

1.3.3 *CaM* 和  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的实时荧光定量分析 根据克隆到的苹果 *CaM* 和  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因序列,用 PerlPrimer 软件设计荧光定量引物 (表 1)。采用 TAKARA 公司的 Perfect Real-time 试剂盒 (含 SYBR Green I 荧光染料),使用 Bio-Rad 公司的 IQ5 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。为了保证反应条件一致,将各 PCR 体系所需的共同组分组成混合液再均分,然后加入差异组分,如模板、引物等。定量 PCR 循环程序为 95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。以持家基因 *Actin* 为内参基因 (引物序列见表 1),10 μmol/L 上下游引物各 1 μL。Real-time PCR 完成后,统计 PCR 仪记录的相应引物对应模板的 SQ 值 (Starting Quantity)。相同模板下,用扩增目标基因的 SQ 值除以扩增 *Actin* 基因的 SQ 值,得到目标基因在这个处理中表达的相对丰度,依此类推算目标基因在其他处理中表达的相对丰度。

试验数据采用 SPSS11.5 软件对试验数据进行方差分析和多重比较。

表 1 基因克隆及实时荧光定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primers for gene clone and real-time PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
基因克隆引物 Primers for gene clone	
<i>CaM</i> -Up	5'-ATG GC(C\G) GA(C\T) CA(G\A) CT(T\G) AC(A\C\T) GACGA-3'
<i>CaM</i> -Down	5'-TCA CTT (T\G\C\A) GCC ATC AT(A\G\C) A(C\T)(C\T) TT-3'
CAP-Up	5'-AACCA(A\T)(A\T)(A\T\G)(A\G)(A\T\G)AC(A\T\G)GC(A\T\G)(A\G)AGGC-3'
CAP-Down	5'-ACTAT(A\T\G\C)GT(G\A)(G\C)(A\T)GAA(G\A)TT(G\A)TCATC-3'
实时荧光定量 PCR 引物 Primers for Real-time PCR	
<i>CaM</i> -F	5'-AGTCTCTTTGACAAGGACGGC-3'
<i>CaM</i> -R	5'-GGTTCATTACCATCAGCATCA-3'
CAP-F	5'-TCCTCACCTTTAGACAAGCAGG-3'
CAP-R	5'-TTACATTCGCTCCATCACCA-3'
<i>Actin</i> -F	5'-TCACAGCAGACTCAGGGATACC-3'
<i>Actin</i> -R	5'-GGAATCCAGCAGGATACCAG-3'

## 2 结果与分析

### 2.1 不同钙处理下苹果果实可溶性 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 含量的变化

与对照相比,培养液中加钙处理 6 h 后,苹果果实的可溶性 Ca<sup>2+</sup> 含量显著增加;处理 12 h 后高钙处理 (Ca 10) 果实中的可溶性 Ca<sup>2+</sup> 含量达到峰值,并随加钙量的增加而增加;处理 24 h 后低钙处理 (Ca 1) 果实中的可溶性 Ca<sup>2+</sup> 含量达到峰值。当培养液中加入 5 mmol/L EGTA 时 (钙专

性螯和剂,即缺钙处理),果实可溶性 Ca<sup>2+</sup> 含量显著降低,并且随着处理时间的延长而逐渐下降 (图 1a)。

与对照 (Ca 0) 相比,高钙处理 (Ca 10) 12 h 后苹果果实 CaM 含量显著增加,低钙处理 (Ca 1) 24 h 后苹果果实 CaM 含量显著增加;加钙处理 48 h 后果实 CaM 含量开始下降。在缺钙处理下,处理 6 h 后苹果果实 CaM 含量显著增加,处理 12 h 后 CaM 含量达到峰值,之后一直维持较高水平 (图 1b)。

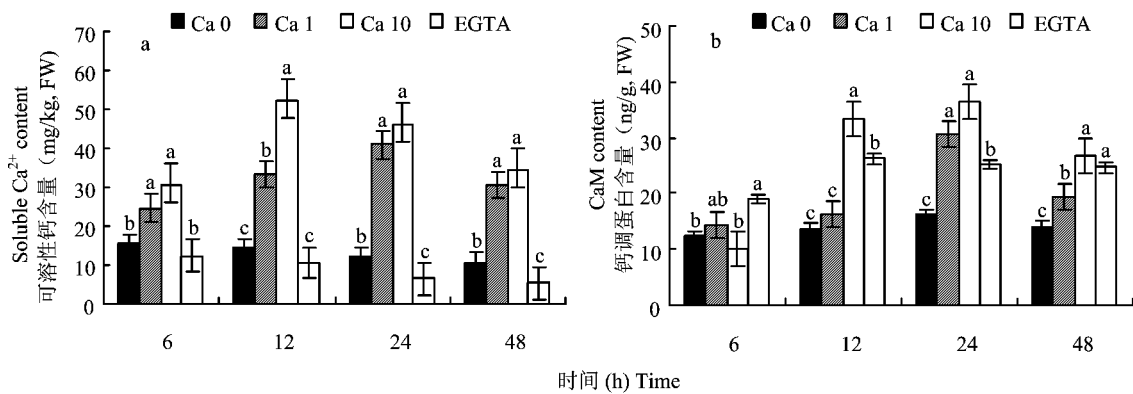


图 1 不同钙处理对苹果果实可溶性 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 含量的影响

Fig.1 Effects of Ca treatment on soluble Ca<sup>2+</sup> and CaM contents of apple fruits

[注 (Note): 柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

### 2.2 不同钙处理下苹果果实质膜和液泡膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的变化

高钙处理 12 h 后,苹果果实质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性显著增加,并随处理时间的延长而增加,处理 48 h 后达到最高;低钙处理 24 h 后,其活性显著增加;缺钙处理 12 h 后,果实质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

显著下降,并随处理时间的延长逐渐下降 (图 2a)。

在培养液中加入钙处理 12 h 内,苹果果实液泡膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性没有显著变化;加钙处理 24 h 后,活性显著增加,并随着钙浓度的增加以及处理时间延长而增加;缺钙处理显著降低果实液泡膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性 (图 2b)。

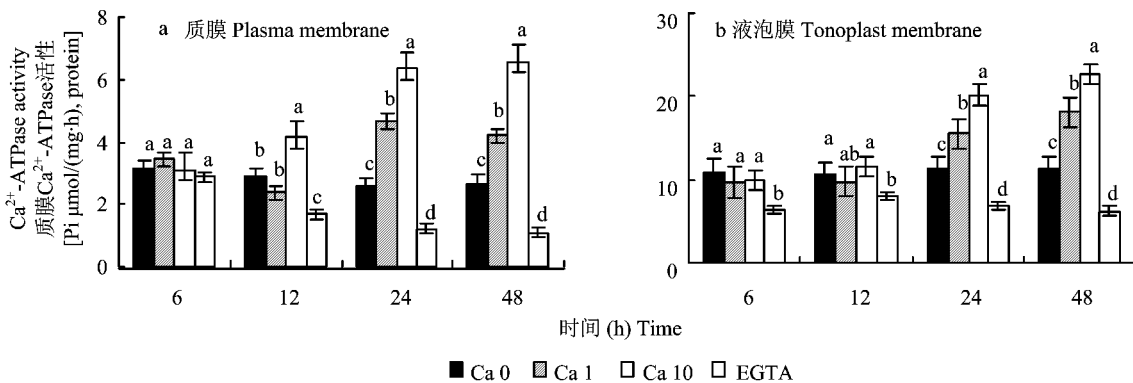


图 2 不同钙处理对苹果果实质膜和液泡膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的影响

Fig.2 Effects of Ca treatment on Ca<sup>2+</sup>-ATPase activities in plasma membrane and tonoplast membrane of apple fruits

[注 (Note): 柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

### 2.3 苹果果实 *CaM* 和 $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的分离

2.3.1 苹果果实 *CaM* 基因的克隆 以 Adaptor-dT 为引物,以从苹果果实所提取的总 RNA 为模板进行反转录合成第一链 cDNA,以此 cDNA 为模板,用 *CaM* 基因的一对简并引物进行 PCR 扩增,获得 450

bp 的基因序列。采用生物信息学方法 (NCBI 在线服务器 Protein BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>),发现该基因序列具有 *CaM* 基因特有的  $Ca^{2+}$  结合位点 (图 3),说明所克隆的基因是苹果 *CaM* 基因,并在 GenBank 注册 (注册号: HM369505)。

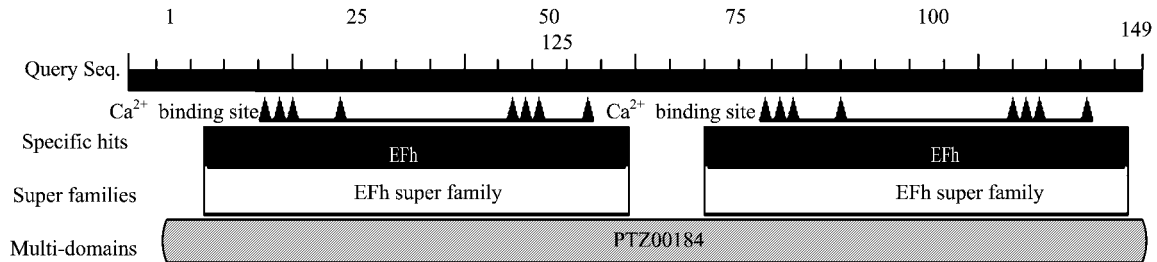


图 3 苹果 *CaM* 基因的功能结构域

Fig. 3 Functional domain of *CaM* gene of apples by bioinformatics analysis

2.3.2 苹果果实  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的克隆 以苹果 cDNA 为模板,用  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的一对简并引物进行 PCR 扩增,获得 374bp 的基因序列。采用生物信息学方法 (Protein BLAST),发现该基因序列

具有  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因特有的功能结构域 E1-E2 ATPase super family (图 4),说明所克隆的基因是苹果  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因,已在 GenBank 注册 (注册号: HM369504)。

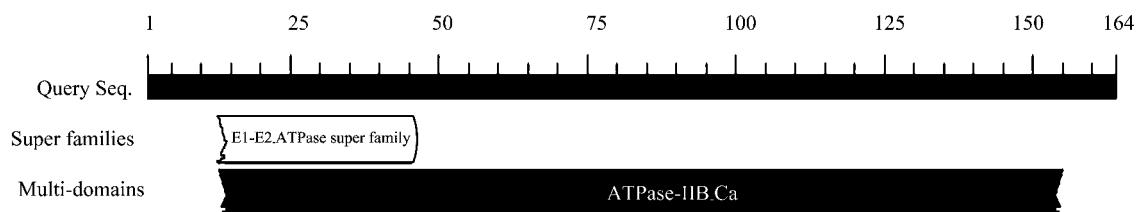


图 4 苹果  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的功能结构域

Fig. 4 Functional domain of  $Ca^{2+}$ -ATPase gene of apples by bioinformatics analysis

### 2.4 不同钙处理对苹果果实 *CaM* 和 $Ca^{2+}$ -ATPase 基因表达的影响

根据已经克隆的苹果 *CaM* 和  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因序列设计荧光定量引物 (表 1),采用荧光定量 PCR (Real-time PCR) 分析苹果 *CaM* 和  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的表达特征。本研究采用的基因表达量是相对表达量,即相对于持家基因 *Actin* 的表达量。结果看出,高钙处理 6 h 后苹果 *CaM* 基因的表达量显著增加,低钙处理 24 h 后 *CaM* 基因的表达量显著增加,然后 *CaM* 基因的表达量维持在较高水平。在缺钙处理下,果实 *CaM* 基因表达量同样显著增加,并随缺钙处理时间延长该基因表达量维持较高水平 (图 5a),这与苹果果实 *CaM* 含量变化趋势基本一致 (图 1b)。

高钙处理 12 h 后,苹果  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的表达量显著增加,而低钙处理 48 h 后  $Ca^{2+}$ -ATPase 基

因的表达量显著增加 (图 5b)。但是当培养液中加入 EGTA 时 (缺钙处理),与对照相比,苹果  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的表达量并未显著下降 (图 5b)。

## 3 讨论

苹果果实喷钙可以延缓果实后熟衰老,幼果喷钙并配施 NAA,可显著提高果实硬度,降低苦痘病发病率<sup>[2, 23-24]</sup>。现有研究表明,苹果果实活性氧代谢与钙素营养关系密切,钙通过调控活性氧清除酶系统 (如 SOD、CAT 及 POD 等酶的活性) 协同变化,有效地减少体内活性氧积累,实现果实体内生理代谢的平衡<sup>[4, 29]</sup>。本研究发现,苹果切片外源补钙,可以在短时间内显著增加细胞中可溶性  $Ca^{2+}$  含量 (图 1a)。然而,钙作为细胞内第二信使,是通过与 *CaM* 结合,调控苹果果实的生理失调过程<sup>[1, 3, 6, 13]</sup>。在本研究中,果实切片外源补钙,在短

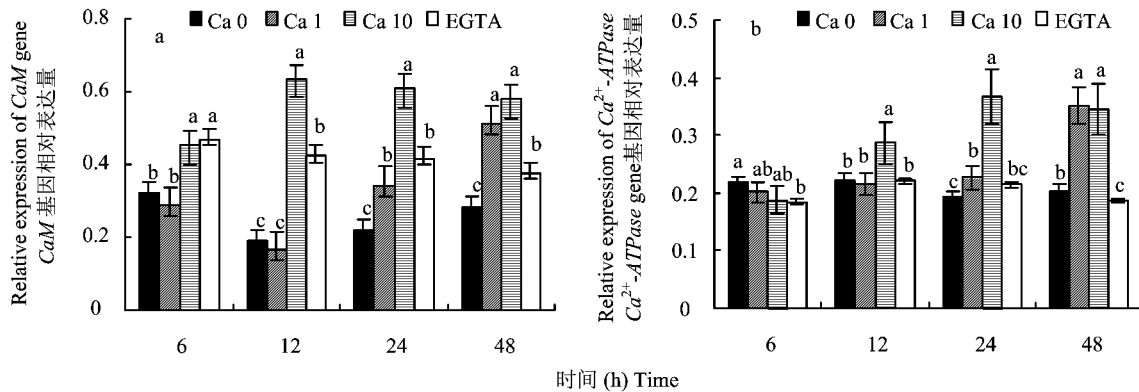


图5 不同钙处理下苹果果实 *CaM* 和  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的表达特征

Fig. 5 Expression patterns of *CaM* and  $Ca^{2+}$ -ATPase genes of apples in different Ca treatments by real-time PCR

[注(Notes): 柱上不同字母表示差异达5%显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

时间内显著增加可溶性  $Ca^{2+}$  含量的同时,还可以显著增加 *CaM* 含量,并且两者均在高钙处理 12 h 达到高峰(图 1a、b)。证实了苹果补钙措施,可以及时启动苹果细胞钙信使系统的信号传导。Kim 等<sup>[6]</sup> 新近研究表明,*CaM* 与  $Ca^{2+}$  结合,通过蛋白激酶、蛋白磷酸化酶、转录因子结合蛋白等途径在转录水平,可以进一步启动活性氧代谢相关基因的表达。这就可以很好地解释苹果补钙措施能够调控活性氧清除酶系统协同变化,促进活性氧代谢平衡的生理机制。本研究还看出,苹果果实缺钙处理(即加入 5 mmol/L EGTA),同样可以造成苹果果实 *CaM* 含量显著增加(图 1b)。在苹果果实表现生理性缺钙时,尽管果实细胞中 *CaM* 含量显著增加,但是由于可溶性  $Ca^{2+}$  含量显著下降,*CaM* 不能与细胞内足够的  $Ca^{2+}$  结合,从而不能有效的启动各种生理防御反应,加重生理代谢失调。

苹果果实细胞内的  $Ca^{2+}$  含量只有保持极低浓度的稳态水平,才能发挥其正常生理功能。在维持胞质内低  $Ca^{2+}$  浓度水平上, $Ca^{2+}$ -ATPase 起着重要作用,因为它可以将  $Ca^{2+}$  主动运出细胞或运进细胞器,调节细胞溶质  $Ca^{2+}$  浓度<sup>[11-12]</sup>。在本研究中,果实切片外源补钙,加钙处理 12 h 质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性显著增加(图 2a),而胞内 *CaM* 含量加钙处理 12 h 也显著增加,两者变化趋势一致,说明质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性受细胞内 *CaM* 所调控。Axelsen 和 Palmgren<sup>[30]</sup> 研究证实,质膜型  $Ca^{2+}$ -ATPase 在氨基酸序列末端含有 *CaM* 结合区域,表明该酶能够被 *CaM* 激活。在本研究中,加钙处理 24 h 液泡膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性显著增加(图 2b),与胞内 *CaM* 含量显著增加时间不一致,滞后 12 h,表明液泡膜

$Ca^{2+}$ -ATPase 活性不受细胞内 *CaM* 所调控,可能受其他调控因子所调控。本研究还发现,果实切片加钙处理 24 h 后,伴随着质膜和液泡膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性显著增加(图 2a、b),果实细胞内可溶性  $Ca^{2+}$  含量显著下降,证实了质膜和液泡膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 在维持苹果胞内  $Ca^{2+}$  浓度平衡上起着重要作用。质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性虽然受细胞内 *CaM* 所调控,但是在果实缺钙处理下,细胞内 *CaM* 含量增加而质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性反而显著下降,表明胞内 *CaM* 可能对质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性负调控或者还可能存在其他因子调控其活性。Tidow<sup>[31]</sup> 等认为,PMCA 是  $Ca^{2+}$ -ATPase 的一个负调控子,通过结合该酶的 N 末端,并借助  $Ca^{2+}$ -*CaM* 复合体的参与实现自动抑制  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性。

本研究表明,加钙处理 6 h 苹果 *CaM* 基因的表达量显著增加(图 5a),而在生理水平加钙处理 12 h *CaM* 含量才显著增加(图 1b),两者的变化并不一致,说明 *CaM* 基因可能存在翻译水平上的修饰(即翻译水平调控)。植物  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因是一个多基因家族,如从拟南芥克隆到 *ACA1*、*ACA2*、*ACA3* 和 *EAC1* 等<sup>[15-16]</sup>,前两个基因属于质膜型  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因(受 *CaM* 调控),后两个基因属于内质网型  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因(不受 *CaM* 调控)。本研究中,只从苹果成功克隆到一个  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因,该基因的表达情况是加钙处理 12 h 苹果  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因的表达量显著增加(图 5b),而对应生理水平加钙处理 12 h *CaM* 含量及质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性显著增加(图 1b 和图 2a),两者的变化一致,说明从苹果克隆的  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因可能属于质膜型  $Ca^{2+}$ -ATPase 基因(即受 *CaM* 调控)。然而在果实切片缺

钙处理下,苹果  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 基因的表达量未发生显著变化(图 5b),与生理水平质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性变化不一致(图 2a)。由于质膜型  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 基因存在 CaM 以及其它调控因子的结合位点<sup>[30-31]</sup>,因此,苹果  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 基因的表达存在一个翻译后调控,这可能是造成  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 基因表达与酶活性不一致的原因。

总之,苹果补钙措施可以通过在生理水平上提高细胞内可溶性  $\text{Ca}^{2+}$  及 CaM 含量,以及在分子水平提高 CaM 基因的表达量,有效启动钙信使系统;质膜及液泡膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 是调控胞内  $\text{Ca}^{2+}$  关键的酶,通过提高质膜及液泡膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性及 CaM 和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 基因的表达量,维持细胞内低浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的稳态水平。

#### 参 考 文 献:

- [1] Lanaukas J, Kvikliene N. Effect of calcium application on some fruit quality characteristics of "Sinap Orlovskij" apple [J]. Agron. Res., 2006, 4(1): 31-36.
- [2] Adriana T, Hoover E, Rosen C *et al.* The effect of calcium sprays and fruit thinning on bitter pit incidence and calcium content in 'Honeycrisp' apple[J]. J. Plant Nutr., 2006, 29(11): 1941-1957.
- [3] Kadir S A. Fruit quality at harvest of "Jonathan" apple treated with foliarly-applied calcium chloride[J]. J. Plant Nutr., 2004, 27(11): 1991-2006.
- [4] 陈见晖,周卫. 钙对苹果果实过氧化物酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖分解酶活性的影响[J]. 中国农业科学,2004, 37(3): 400-405.  
Chen J H, Zhou W. Effects of calcium on peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucan synthetase and  $\beta$ -1,3-glucanase in apple (*Malus pumila*) fruits[J]. Sci. Agric. Sin., 2004, 37(3): 400-405.
- [5] Liu H T, Li B, Shang Z L *et al.* Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat[J]. Plant Physiol., 2003, 132(3): 1186-1195.
- [6] Kim M C, Chung W S, Yun D J *et al.* Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants[J]. Mol. Plant., 2009, 2(1): 13-21.
- [7] Phean-O-Pas S, Punteeranurak P, Buaboocha T. Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa* L. [J]. J. Biochem. Mol. Biol., 2005, 38(4): 432-439.
- [8] McCormack E, Tsai Y C, Braam J. Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs[J]. Trends Plant Sci., 2005, 10(8): 383-389.
- [9] Yang T B, Poovaiah B W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants[J]. Trends Plant Sci., 2003, 8(10): 505-513.
- [10] Askerlund P. Calmodulin-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the vacuolar and plasma membranes in cauliflower [J]. Plant Physiol., 1997, 114: 999-1007.
- [11] Wang C Q, Zhang Y F, Liu T. Activity changes of calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase during low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Alternanthera bettzickiana* [J]. Physiol. Plant., 2005, 124: 260-266.
- [12] Zhang D X, Li X P, Sun S C *et al.* Involvement of ER-calreticulin- $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression[J]. Mol. Reprod. Dev., 2010, 77(5): 462-471.
- [13] 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.  
Zong H, Hu W Y. Changes of calcium messenger component during storage of apple with sodium alginate coating[J]. Acta Horticult. Sin., 1998, 25(2): 187-188.
- [14] 周卫,何萍. 苹果果肉质膜微囊主动运输  $\text{Ca}^{2+}$  的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酶特性研究[J]. 植物生理学报,1999,25(2): 151-158.  
Zhou W, He P. Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase which drives active transport of  $\text{Ca}^{2+}$  in plasma membrane vesicles isolated from pulp cell of *Malus pumila* fruits [J]. Acta Phytophy. Sin., 1999, 25(2): 151-158.
- [15] Wimmers L E, Ewing N N, Bennett A B. Higher plant  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: Primary structure and regulation of mRNA abundance by salt[J]. Proc. Nat. Acad. Sci., 1992, 89: 9205-9209.
- [16] Hauser K, Pavlovic N, Kissmehl R *et al.* Molecular characterization of a sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene from *Paramecium tetraurelia* and localization of its gene product to sub-plasmalemmal calcium stores[J]. Biochem. J., 1998, 334(1): 31-38.
- [17] Hwang I, Harper J F, Liang F *et al.* Calmodulin activation of an endoplasmic reticulum-located calcium pump involves an interaction with the N-terminal autoinhibitory domain [J]. Plant Physiol., 2000, 122: 157-168.
- [18] Ling V, Perera I, Zielinski R E. Primary structures of Arabidopsis calmodulin isoforms deduced from the sequences of cDNA clones[J]. Plant Physiol., 1991, 96: 1196-1202.
- [19] Pheanopas S, Punteeranurak P, Buaboocha T. Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa* L. [J]. J. Biochem. Mol. Biol., 2005, 38(4): 432-439.
- [20] Luit A H, Olivari C, Haley A *et al.* Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco [J]. Plant Physiol., 1999, 121: 705-714.
- [21] Siddiqui S, Bangerth F. Studies on cell wall mediated changes during storage of calcium infiltration apples[J]. Acta Horticult., 1993, 326: 105-110.
- [22] Picchioni G A, Watada A E, Conway W S *et al.* Post harvest calcium infiltration delays membrane lipid catabolism in apple fruit[J]. J. Agric. Food Chem., 1998, 46(7): 2452-2457.
- [23] 关军锋,李广敏,李滨,等.  $\text{Ca}^{2+}$  对苹果果实过氧化物酶活性及其分泌的影响[J]. 华北农学报,2004,19(1): 79-81.

- Guan J F, Li G M, Li B *et al.* The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on peroxidase activity and secretion of apple fruit tissues[J]. *Acta Agric. Bor. Sin.*, 2004, 19(1): 79–81.
- [24] 周卫,张新生,何萍,等. 钙延缓苹果果实成熟衰老作用的机理[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(6): 73–79.  
Zhou W, Zhang X S, He P *et al.* Mechanism of delaying maturation and senescence by calcium in apple fruit[J]. *Sci. Agric. Sin.*, 2000, 33(6): 73–79.
- [25] 缪颖,毛节铸,巢建福,等. 钙处理对水蜜桃和梨果实中钙含量、细胞膜透性和代谢产物的影响[J]. *植物生理学通讯*, 1991, 27(3): 184–186.  
Miu Y, Mao J Z, Chao J F *et al.* Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  treatment on calcium contents, membrane permeability and metabolites in pear and peach fruits[J]. *Plant Physiol. Comm.*, 1991, 27(3): 184–186.
- [26] 罗允,马湘陶,彭抒昂. 果树生理研究中 CaM 的 ELISA 测定[J]. *果树科学*, 1996, 15(2): 180–184.  
Luo Y, Ma X T, Peng S A. The determined of CaM in ELISA in the study of fruit physiology[J]. *J. Fruit Sci.*, 1996, 15(2): 180–184.
- [27] Thomson L J, Xing T, Hall J L *et al.* Investigation of the calcium transporting ATPases at the endoplasmic reticulum and plasma membrane of red beet (*Beta vulgaris*) [J]. *Plant Physiol.*, 1993, 102: 553–564.
- [28] Rasi-Caldogno F, Pugliarello M C, Olivaria C *et al.* Identification and characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase which drives active transport of  $\text{Ca}^{2+}$  at the plasma membrane of radish seedlings [J]. *Plant Physiol.*, 1989, 90: 1429–1434.
- [29] Choi H W, Lee D H, Hwang B K. The pepper calmodulin gene *CaCaMI* is involved in reactive oxygen species and nitric oxide generation required for cell death and the defense response[J]. *Mol. Plant Microb. Inter.* 2009, 22(11): 1389–1400.
- [30] Axelsen K B, Palmgren M G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily[J]. *Mol. Evol.*, 1998, 46: 84–101.
- [31] Tidow H, Hein K L, Baekgaard L *et al.* Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of calmodulin in complex with the regulatory domain of the plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ACA8[J]. *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct Biol. Cryst. Comm.*, 2010, 66: 361–363.