

外源钙对高温强光胁迫下小麦叶中蛋白激酶活性和 D1 蛋白磷酸化的影响

李利红^{1,2}, 梁书荣³, 曲小菲³, 赵会杰^{3,*}

¹河南农业大学农学院, 郑州 450002; ²郑州牧业工程高等专科学校药物工程系, 郑州 450011; ³河南农业大学生命科学院, 郑州 450002

摘要: 检测灌浆期叶面喷施 10 mmol·L⁻¹CaCl₂ 和 1 mmol·L⁻¹蛋白激酶抑制剂(FSBA)对高温强光胁迫下小麦叶中蛋白激酶活性和D1蛋白磷酸化影响的结果表明, CaCl₂可提高而蛋白激酶抑制剂则抑制高温强光下蛋白激酶活性和D1蛋白含量及其磷酸化水平。

关键词: 小麦; 高温强光; Ca²⁺; 蛋白激酶; D1 蛋白磷酸化

Effects of Ca²⁺ on the Activiy of Protein Kinases and Phosphorylation of D1 Protein in Wheat (*Triticum asetivum* L.) Leaves under Heat and High Irradiance Stress

LI Li-Hong^{1,2}, LIANG Shu-Rong³, QU Xiao-Fei³, ZHAO Hui-Jie^{3,*}

¹College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²Department of Pharmaceutical Engineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China; ³College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: This article aimed at proving the effects of 10 mmol·L⁻¹ CaCl₂ and 1 mmol·L⁻¹ FSBA on the protein kinases activity and D1 protein phosphorylation in leaves of wheat (*Triticum asetivum*) at filling stage under high temperature and irradiance stress. Results showed that pretreatment with CaCl₂ improved remarkably the activity of protein kinases and increased the content of D1 protein and it's phosphorylation, while FSBA had the reverse effects.

Key words: wheat; high temperature and irradiance stress; Ca²⁺; protein kinase; phosphorylation of D1 protein

植物体内的蛋白磷酸化主要参与调节代谢途径中酶的活性、植物细胞信号的转导过程以及在不同层次上调节有关基因的表达, 多种胞外刺激如光照、温度和激素等在胞内的传递中均涉及蛋白质的磷酸化过程(吴能表等 2004)。越来越多的证据表明, 蛋白磷酸化在高等植物光合机构对环境的适应和调节中都有作用(Ebbert 和 Godde 1996)。

在我国北方地区, 小麦灌浆期间经常遭遇到高温和强光共存的逆境因素胁迫。在这种条件下, 植物光合作用易受强光的抑制和破坏, 不仅 PS II 光化学效率及电子传递速率明显下降(La Porta 等 2004; 李利红等 2009), 而且 PS II 反应中心蛋白也遭破坏, 从而导致光抑制(Yamamoto 2001)。近年来, 随着光抑制机制及光系统 II 功能(刘文娟等 2007)研究的深入, 人们逐渐将注意力转向外源物质对光合机构的防护效应和作用机制的探讨。Ca²⁺ 作为植物生长发育的第二信使常得到广泛关注, 缓

解植物高温伤害的研究发现, 外源Ca²⁺可提高和保护高温胁迫下花生中Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶的活性(宰学明等 2007); 还可促进水杨酸(salicylic acid, SA)对葡萄耐热性的诱导(刘悦萍等 2005)。这些研究表明, Ca²⁺和CaM可能是植物热激信号转导途径中的组分。但是, 外源钙在遭受高温和强光胁迫的植物的保护作用还少有报道。本文在以前研究的基础上(李利红等 2009), 检测了外源钙对小麦叶蛋白激酶和叶绿体 D1 蛋白磷酸化的影响, 以期生产中采用抗逆应变技术提供参考。

材料与方 法

以小麦(*Triticum asetivum* L.)品种‘豫农 949’

收稿 2009-12-09 修定 2010-01-29

资助 国家自然科学基金项目(30971725, 30671214)。

* 通讯作者(E-mail: zhaohj303@163.com; Tel: 0371-63555319)。

为材料, 试验于2008年10月~2009年6月在本校科教园区进行。采用盆栽试验, 盆高40 cm, 内径40 cm, 盆内装入20 kg 耕层潮土。土壤的有机质含量为10.5 g·kg⁻¹(土), 全氮含量为1.01 g·kg⁻¹(土), 碱解氮含量为75.4 mg·kg⁻¹(土), 速效磷为26.7 mg·kg⁻¹(土), 速效钾为87.6 mg·kg⁻¹(土)。10月15日播种, 播种后将盆埋入试验田土中, 出苗后每盆留苗5株, 常规管理。旗叶完全展开时, 将其分为3组: (1)喷水作为对照, (2)喷CaCl₂, (3)作蛋白激酶抑制剂(5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine, FSBA)处理。CaCl₂浓度经过前期筛选, 采用最佳浓度10 mmol·L⁻¹, 每天喷1次, 连喷5 d。喷后3 d将盆带回实验室, 参照Zhang和Xu (2003)文中的方法将实验组(3)进行FSBA处理。然后进行温、光处理, 其流程为: 在人工气候室中设置一铁架, 上放置1 cm厚的流动水槽(钨灯与材料之间), 高照度光源为1 000 W钨灯, 通过调整灯的高度控制光照到旗叶上的辐射强度。照光前各处理先作12 h的暗适应, 然后置于人工气候室中进行高温和强光胁迫处理(36 °C, 1 800 μmol·m⁻²·s⁻¹)。于高温强光处理的0 h(照光前)、1 h、3 h以及正常温光条件下(25 °C、600 μmol·m⁻²·s⁻¹)恢复3 h后取样。每个处理重复4次, 所取旗叶样品立即置于液氮中备用。

蛋白质含量采用考马氏亮蓝法(邹琦2003)测定。

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blotting进行D1蛋白的分离与测定(李利红等2009), 重复3次。以光密度扫描测定D1蛋白的相对含量。

按照王宁宁等(1998)文中方法提取小麦叶中膜蛋白。将小麦叶片于液氮中磨碎后, 按1/3 (*W/V*)比例加入缓冲液1。缓冲液1的配方如下: 0.5 mmol·L⁻¹山梨醇, 50 mmol·L⁻¹ MOPS (3-吗啉丙磺酸, 3-morpholinopropanesulfonic acid, 分子量为209.26) / KOH, 10 mmol·L⁻¹ EGTA, 2.5 mmol·L⁻¹ 焦亚硫酸钾, 0.5 mmol·L⁻¹ 牛血清白蛋白, 1 mmol·L⁻¹ PMSF (苯甲基磺酰氟, phenylmethanesulfonyl fluoride), 2% PVP (聚乙烯基吡咯烷酮, polyvinylpyrrolidone), pH为7.6。混合研磨后, 以10 000×g于4 °C离心15 min; 上清液再以80 000×g离心20 min, 沉淀用缓冲液2(含

15 mmol·L⁻¹ Tris/ 失水苹果酸、0.5 mmol·L⁻¹ 山梨醇、pH为7.3)洗1次, 重悬于缓冲液3中(含3 mmol·L⁻¹ Tris/ 失水苹果酸、0.5 mmol·L⁻¹ 山梨醇、pH为7.3)备用。蛋白的磷酸化参考Sakamoto和Shibata (1992)文中的方法略有改动。40 μL反应体系中含10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、50 mmol·L⁻¹ MOPS/NaOH、2 mmol·L⁻¹ MnCl₂、2 mmol·L⁻¹ DTT, pH 7.5, 加入30 μL蛋白提取液。加入2 μL ATP-[γ-³²P] ATP混合液(1.85×10⁷ Bq·μL⁻¹, 购自中国同位素有限公司)后开始反应, 反应的温度为30 °C, 反应10 min后取20 μL反应混合物涂在经150 mmol·L⁻¹ H₃PO₄ 预处理的Whatman 3MM滤纸片上, 滤纸片放在150 mmol·L⁻¹ H₃PO₄中洗涤6次以除去游离的[γ-³²P] ATP, 以乙醇脱水干燥后用LS-6500液体闪烁计数仪(Beckman公司)进行液体闪烁计数测定磷酸化活性, 以cpm·mg⁻¹(蛋白)表示。

数据采用Excel 2003进行处理, 测定均重复5次, 结果以平均值±标准差(mean±SE)表示, 结合DPS 3.01版软件进行方差分析和多重比较。

结果与讨论

1 外源钙和FSBA对蛋白激酶活性的影响

图1表明, 强光照射下, 无论是否经钙处理, 植株的蛋白激酶活性均上升; 照光3 h条件下, 钙处理植株的蛋白激酶活性极显著高于不作钙处理的; 暗中恢复阶段, 钙处理与否的植株中蛋白激酶活性均下降, 3个处理的酶活性差异不显著。强光下, FSBA处理后的植株酶活性显著低于对照和钙处理植株的酶活性。

2 外源钙和FSBA对D1蛋白磷酸化水平的影响

以Western blotting方法分析D1蛋白结果(图2)表明, 分别以未经钙处理的照光前的磷酸化和非磷酸化的D1蛋白为参照, 测得各处理磷酸化和非磷酸化的D1蛋白的相对含量和方差分析的结果(图3)显示, 各个处理的叶中都存在D1蛋白的磷酸化现象。随着照光时间的延长, D1蛋白磷酸化和非磷酸化均下降, 暗恢复阶段则有所上升。不管在照光前、照光期间, 还是恢复期间, 外源钙均极显著提高D1蛋白含量和D1蛋白的磷酸化水平; FSBA处理后的D1蛋白含量和磷酸化水平极显著下降。

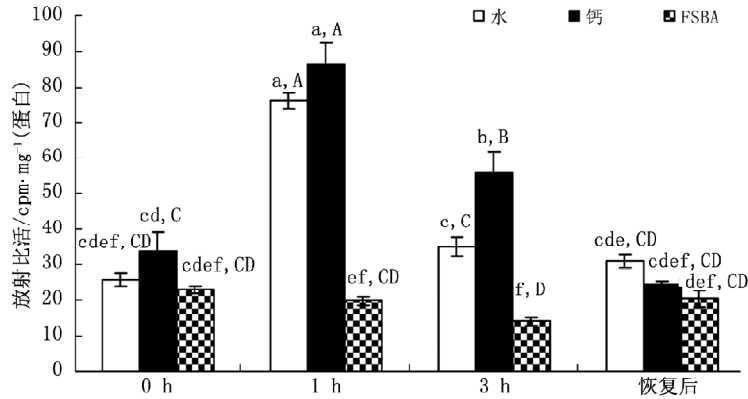


图1 钙离子和FSBA对蛋白激酶活性的影响

Fig.1 Effects of Ca²⁺ and FSBA on the activity of protein kinases

图中0 h、1 h、3 h和恢复后分别表示照光前、照光1 h、照光3 h和恢复3 h后。不同小、大写字母分别表示差异达显著($P<0.05$)和极显著水平($P<0.01$)。

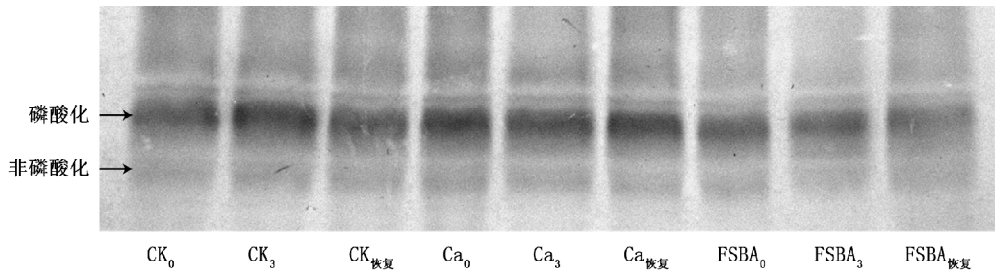


图2 D1蛋白 Western blotting 转膜图

Fig.2 Western blotting mapping of D1 protein

CK₀、CK₃、CK_{恢复}分别指对照(喷水处理)的照光前、照光3 h和恢复3 h; FSBA₀、FSBA₃、FSBA_{恢复}分别指FSBA处理后照光前、照光3 h和恢复3 h; Ca₀、Ca₃、Ca_{恢复}分别指Ca处理后的照光前、照光3 h和恢复3 h; 下同。

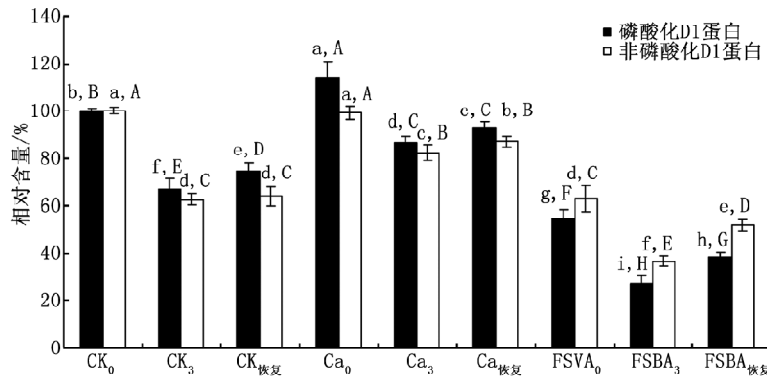


图3 钙离子和FSBA对D1蛋白相对含量的影响

Fig.3 Effects of Ca²⁺ and FSBA on the relative quantity of D1 protein

参考文献

李利红, 杨亚军, 赵会杰, 马培芳(2009). 外源Ca²⁺对高温强光胁迫下灌浆期小麦叶片光和机构运转的影响. 植物生理学通讯,

45 (9): 851~854

刘文娟, 袁澍, 林宏辉(2007). 高等植物的光系统II蛋白磷酸化机制及其对环境胁迫的响应. 植物生理学通讯, 43 (6):

- 995~1000
- 刘悦萍, 黄卫东, 张俊环(2005). 钙-钙调素对水杨酸诱导葡萄幼苗耐热性的影响及与抗氧化的关系. 园艺学报, 32 (3): 381~386
- 王宁宁, 王勇, 王淑芳, 朱亮基, 张韧(1998). 6-BA 延缓大豆叶片衰老的作用与膜蛋白磷酸化状态的关系. 植物生理学报, 24 (3): 305~308
- 吴能表, 何凤, 杨丽萍, 肖文娟(2004). NaCl 对萝卜幼苗逆境指标及蛋白激酶活性的影响. 西南师范大学学报(自然科学版), 29 (4): 651~654
- 宰学明, 钦佩, 吴国荣, 王光, 闫道良(2007). 高温胁迫对花生幼苗光合速率、叶绿素含量、叶绿体 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 及 Ca^{2+} 分布的影响. 植物研究, 27 (4): 416~420
- 邹琦(2003). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社
- Ebbert V, Godde D (1996). Phosphorylation of PS II polypeptides inhibits D1 protein-degradation and increases PS II stability. Photosynth Res, 50: 257~269
- La Porta N, Bertamini M, Nedunchezian N, Muthuchelian K (2004). High irradiance induced changes of photosystem 2 in young and mature needles of cypress (*Cupressus sempervirens* L). Photosynthetica, 42 (2): 263~271
- Sakamoto H, Shibata S (1992). Calcium-dependent protein-phosphorylation in morning glory hypocotyls. Phytochemistry, 31 (7): 2251~2254
- Yamamoto Y (2001). Quality control of photosystem II. Plant Cell Physiol, 42 (2): 121~128
- Zhang HB, Xu DQ (2003). Role of light-harvesting complex 2 dissociation in protecting the photosystem 2 reaction centres against photodamage in soybean leaves and thylakoids. Photosynthetica, 41 (3): 383~391