

盐胁迫下巴西蕉幼苗部分细胞膜系统Ca²⁺-ATPase的活性变化

王文昌^{1,2}, 乔飞², 江雪飞¹, 周双云³, 吉福桑¹, 李新国^{1*}

¹海南大学园艺园林学院, 海口570228; ²中国热带农业科学院热带作物品种资源所, 海南儋州571737; ³广西农业科学院园艺研究所, 南宁530007

摘要: 为研究盐胁迫下微粒体膜Ca²⁺-ATPase活性变化, 试验采用营养液培养的方法, 研究巴西蕉幼苗在60 mmol·L⁻¹的NaCl胁迫4、8、12、24和48 h下, 增加外源CaCl₂和钙离子螯合剂EGTA处理, 测定其叶片和根部分细胞膜上的Ca²⁺-ATPase活性。结果表明, 巴西蕉幼苗根和叶片的质膜、液泡膜及内质网膜的Ca²⁺-ATPase活性各不同, 且CaCl₂处理的Ca²⁺-ATPase活性均显著高于其它3种处理。在NaCl胁迫4 h时, CaCl₂处理的Ca²⁺-ATPase活性均显著升高, 而EGTA处理的则显著下降。幼苗质膜和液泡膜的Ca²⁺-ATPase活性远远大于内质网膜Ca²⁺-ATPase。这说明了质膜和液泡膜Ca²⁺-ATPase活性主要参与巴西蕉幼苗Ca²⁺稳态的调控。

关键词: 巴西蕉幼苗; 盐胁迫; Ca²⁺-ATPase活性

盐胁迫作为一种非生物胁迫, 严重制约着植物的生长和作物的产量(Pérez-Alfocea等1996)。土壤盐渍化属于一个全球性生态问题, 香蕉是盐敏感植物, 土壤盐渍化是香蕉生产面临的重要的非生物逆境之一。钙信号(calcium signal)是植物细胞逆境生理响应的中心调节者, 作为第二信使调控植物生长发育与各种逆境响应(Dodd等2010)。细胞钙信使组分主要包括Ca²⁺、钙调蛋白CaM和膜系统主动运输钙的Ca²⁺-ATP酶(孙静文等2011)。质膜钙泵(Ca²⁺-ATPase)被发现将近50年了, 质膜钙泵简称PMCA, PMCA属于P型ATPase家族, 此类ATPase在其反应循环中会形成一个高能磷酸化中间体(Krebs 2009)。它包含4种亚型PMCA1~PMCA4 (Jensen等2006)。质膜钙泵活性受膜蛋白浓度的影响(Vanagas等2007)。Ca²⁺-ATPase是一个高亲和、低容量的钙运输系统, 其对胞内Ca²⁺平衡起微调作用(Pottosin和Schönknecht 2007)。它参与胞外Ca²⁺运输和胞内Ca²⁺信号(Alexander等2015)。在所有的真核细胞中, 对Ca²⁺的调节起着至关重要的调节作用(Jensen等2004)。一直以来, 植物的抗逆性反应是学者们的研究热点。而Ca²⁺-ATPase作为Ca²⁺的重要调节器, 在植物抗逆过程中起到重要的作用(王海波等2013)。高温、低温等刺激都能引起胞质Ca²⁺水平升高(Jian等2000), 胞内Ca²⁺浓度过高或维持高浓度时间过长会干扰细胞的正常生理代谢, 因此, 要维持细胞生理代谢, 必须把胞质Ca²⁺浓度恢复到正常水平。定位于质膜和细胞器外膜的Ca²⁺-ATPase在维持细胞质内Ca²⁺稳态方面起重要作用(Bonza和Michelis 2011), 也是分化过程中的主

要参与者之一(Boczek等2014)。胞内Ca²⁺-ATPase是细胞膜结构上离子泵的一种, 它可以利用水解释放的能量, 逆浓度梯度将其排出细胞或泵入内质网、液泡等胞内储钙的细胞器即胞内钙库中储存起来, 维持细胞内所必须保持的低浓度的游离钙(王颖2010)。胞质内钙离子水平调节是通过很多调节机制来完成的, 其中的Ca²⁺-ATPase通过把胞质内的Ca²⁺泵出细胞外, 维持细胞内Ca²⁺的稳态(杨蕊等2013), 在提高植物抗逆性及维持细胞在逆境条件下的正常生长发育等方面起着重要作用(张宗申等2001)。绝大多数逆境胁迫都会引起胞质中Ca²⁺浓度的变化, 而胞质中Ca²⁺浓度受Ca²⁺-ATPase的精确调控, 在受到胁迫时, 质膜Ca²⁺-ATPase通过把胞内的钙离子泵出胞外, 维持着胞内钙离子的浓度。为了应对植物发育和环境胁迫信号, Ca²⁺由质膜、液泡膜和内质网膜的Ca²⁺通道内流进入胞质, 导致胞质Ca²⁺浓度迅速增加, 产生钙瞬变和钙振荡, 传递到钙信号靶蛋白, 如钙调素、钙依赖型蛋白激酶及钙调磷酸酶B类蛋白, 引起特异的生理生化反应(周卫和汪洪2007)。但关于盐胁迫下香蕉Ca²⁺-ATPase活性变化还未见报道。本研究以巴西蕉幼苗为试材研究盐胁迫下部分细胞膜系统上Ca²⁺-ATPase活性的变化, 旨在为研究香蕉逆境胁迫下的反应信号传导变化及适应调节提供依据。

收稿 2016-03-07 修定 2016-06-06

资助 国家自然科学基金(31260462)和海南大学中西部计划学科建设项目(ZXBJH-XK008)。

* 通讯作者(E-mail: lixinguo13@163.com)。

材料与方法

1 材料培养

材料选自中国热带农业科学院种苗组培中心的巴西蕉(*Musa acuminata* L. AAA group cv. Brazilian) 幼苗, 苗高约25 cm, 粗度基本一致, 五叶一心, 心叶未展开, 无病虫害。将袋装巴西蕉幼苗取出, 经去土洗净根系后转入1/2Hoagland营养液进行水培, 每3 d更换一次培养液。培养条件为: 光照强度 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间 $14 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 昼夜温度 $27^\circ\text{C}/21^\circ\text{C}$, 相对湿度85%~90%, 培养期间用电动气泵全天持续对营养液通气。预培养6 d后设置对照、 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl+ $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 和 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl+ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA 4种处理。分别处理0、4、8、12、24和48 h后取材。分别称取2.0 g的叶片和根, 用锡箔纸包好, 液氮速冻, -80°C 下保存备用。

2 实验方法

2.1 微粒体膜的制备

参考樊秀彩等(2003)的方法, 略作修改。2 g 冷冻的材料加入20 mL微粒体膜提取液, 其组分为: $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗坏血酸、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF (使用前加入)、5%甘油、 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, 调制 $\text{pH}=8.9$ 。冰浴研磨后, 在超速冷冻离心机 $10\ 000\times g$ 离心15 min, 将上清液 $100\ 000\times g$ 冷冻离心1 h, 弃去上清液, 沉淀用少量悬浮液(内含 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Mes、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, $\text{pH}=7.0$)溶解, 即得微粒体膜制剂, 立即进行各项指标的测定。

2.2 质膜 Ca^{2+} -ATPase活性的测定

参照赵士诚等(2008)和张俊环等(2006)的方法, 略作修改。1 mL反应液中含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Mes ($\text{pH}=6.5$)、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP- Na_2 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 、 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaNO_3 、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、0.02% (V/V)曲拉通X-100, 50 μL 膜微囊制剂。酶反应由50 μL $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ATP- Na_2 启动。 37°C 下保温反应30 min后加0.2 mL的20% TCA终止反应, 所有的空白不加ATP- Na_2 , 反应释放的无机磷用高丽萍和魏涛(2013)的方法测定(中止反应及无机磷测定方法下同)。酶活性用每毫克蛋白质

每分钟分解ATP释放无机磷的含量来表示 [$\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$]。

2.3 液泡膜 Ca^{2+} -ATPase活性的测定

1 mL反应液中含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Mes ($\text{pH}=6.0$)、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP- Na_2 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、0.02% (V/V)曲拉通X-100, 50 μL 膜微囊制剂。酶反应由50 μL $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ATP- Na_2 启动。 37°C 下保温反应30 min后加0.2 mL的20% TCA终止反应并测定无机磷的含量。酶活性用每毫克每分钟蛋白质分解ATP释放无机磷的含量来表示。

2.4 内质网膜 Ca^{2+} -ATPase活性的测定

1 mL反应液中含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Mes ($\text{pH}=6.5$)、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP- Na_2 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 、 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 、 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaNO_3 、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、0.02% (V/V)曲拉通X-100, 50 μL 膜微囊制剂。酶反应由50 μL $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ATP- Na_2 启动。 37°C 下保温反应30 min后加0.2 mL的20% TCA终止反应并测定无机磷的含量。酶活性用每毫克蛋白质每分钟分解ATP释放无机磷的含量来表示。

实验结果

1 盐胁迫下巴西蕉幼苗根的质膜、液泡膜、内质网 Ca^{2+} -ATPase活性的变化

由图1可知, 巴西蕉幼苗根中, 对照处理的质膜 Ca^{2+} -ATPase活性从4 h微下降, 之后缓慢上升, 于12 h达到峰值, 之后略有下降。NaCl处理的质膜 Ca^{2+} -ATPase活性呈现下降趋势, 之后变化趋于平缓。NaCl+ CaCl_2 处理的呈现双波峰的趋势, 从4 h起急剧上升, 于12 h达到峰值, 之后略有下降。NaCl+EGTA处理的呈现下降趋势, 从4 h起急剧下降, 之后变化不明显。在NaCl处理24 h的质膜 Ca^{2+} -ATPase活性略低于对照处理, 48 h时则偏高于对照处理。在4~48 h, 对照处理、NaCl+ CaCl_2 和NaCl+EGTA处理的质膜 Ca^{2+} -ATPase活性没有发生显著变化, NaCl+ CaCl_2 处理始终显著高于其它3种处理($P<0.05$), NaCl+EGTA处理始终显著低于其它3种处理。

由图2可知, 巴西蕉幼苗根的液泡膜中, 对照处理的 Ca^{2+} -ATPase活性变化不明显。NaCl处理的 Ca^{2+} -ATPase活性急剧下降, 之后没有明显变化。

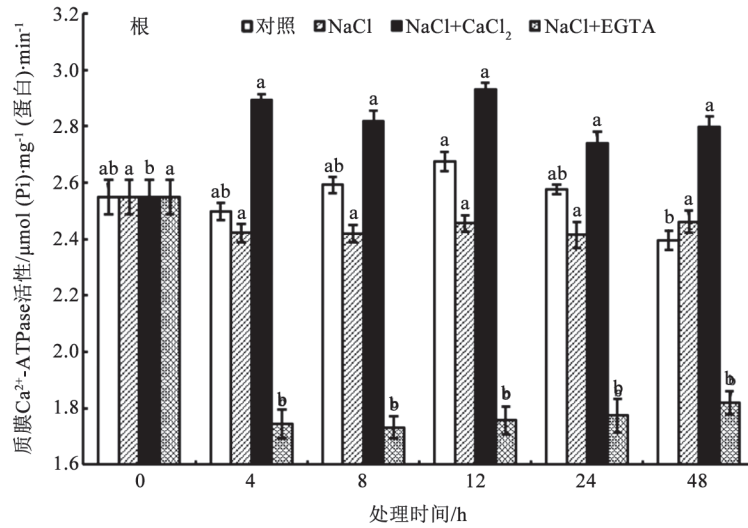


图1 盐胁迫下巴西蕉根质膜Ca²⁺-ATPase活性

Fig.1 Ca²⁺-ATPase activities in plasma membrane of the root of Brazilian banana seedling under salt stress

不同小写字母标识表示同一处理不同时间的差异显著性($P<0.05$)。下图同此。

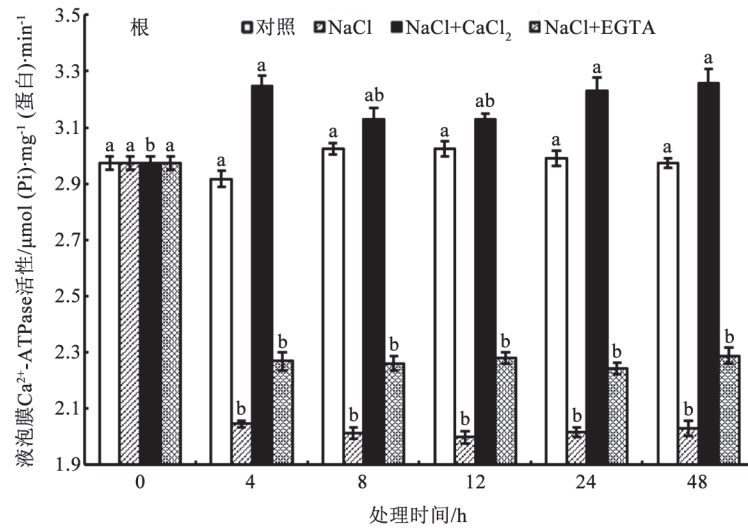


图2 盐胁迫下巴西蕉幼苗根液泡膜Ca²⁺-ATPase活性

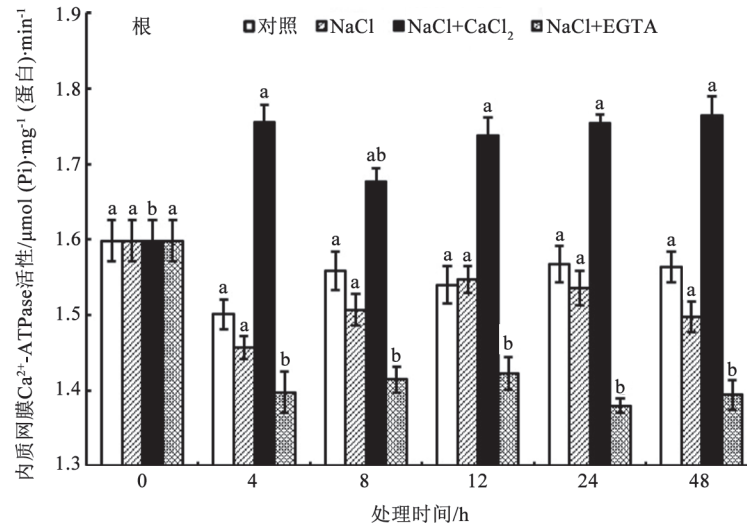
Fig.2 Ca²⁺-ATPase activities in tonoplast membrane of the root of Brazilian banana seedling under salt stress

NaCl+CaCl₂处理的急剧上升,在4 h达到了峰值,之后变化不明显。NaCl+EGTA处理在4 h急剧下降,之后变化不明显。在4~48 h内,4种处理其活性均没有发生显著变化。NaCl处理始终显著低于其他三种处理,而NaCl+CaCl₂处理始终显著高于其它3种处理($P<0.05$)。

由图3可知,巴西蕉幼苗根中,对照处理的内质网膜Ca²⁺-ATPase活性在4 h略有下降之后变化不明显。NaCl处理也表现得和对照处理一致。NaCl+CaCl₂处理在4 h急剧上升,在8 h略有下降,之后变

化不明显。NaCl+EGTA处理在4 h急剧下降,之后变化不明显。在处理4 h时,除了NaCl+CaCl₂处理显著上升之外($P<0.05$),其它三种处理均呈现下降趋势,NaCl+EGTA处理则显著降低($P<0.05$)。在4~48 h期间,4种处理的变化不明显。NaCl处理12 h时其活性略高于对照处理。NaCl+CaCl₂处理始终显著高于其它三种处理($P<0.05$)。

由图1~3可知,巴西蕉幼苗根的质膜、液泡膜和内质网膜的Ca²⁺-ATPase活性,NaCl胁迫下CaCl₂处理始终显著高于其它三种处理($P<0.05$)。在4 h

图3 盐胁迫下巴西蕉根内质网膜Ca²⁺-ATPase活性Fig.3 Ca²⁺-ATPase activities in endoplasmic reticulum membrane of the root of Brazilian banana seedling under salt stress

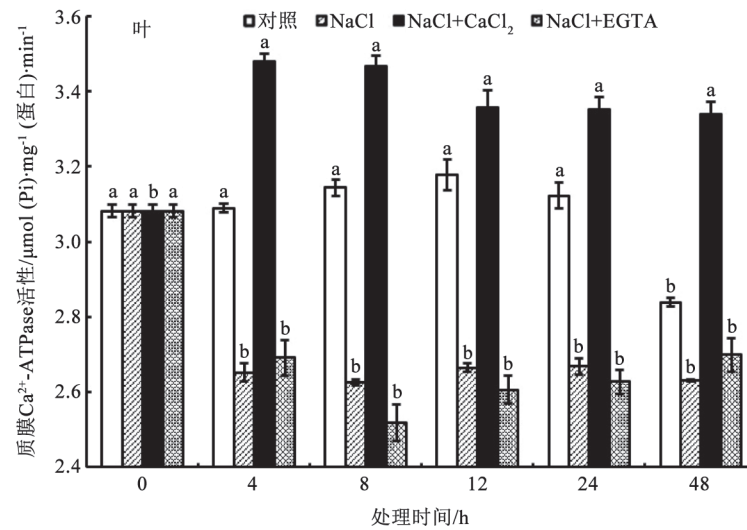
时,除了CaCl₂处理的呈上升趋势外,其它3种处理的钙泵活性均呈下降趋势。在4~48 h,各处理间各膜的Ca²⁺-ATPase活性变化均不明显。在NaCl胁迫到达一定程度时,质膜和液泡膜的Ca²⁺-ATPase活性会大于对照处理。

2 盐胁迫下巴西蕉幼苗叶片质膜、液泡膜和内质网Ca²⁺-ATPase活性变化

由图4可知,巴西蕉幼苗叶片质膜的Ca²⁺-ATPase活性与根的类似,对照处理呈现微上升再下降的趋势,到24 h时,变化均不明显;在48 h显著下降。

NaCl处理在4 h显著下降,之后之后变化趋于平缓;NaCl+CaCl₂处理呈现先上升后下降的趋势,在4 h急剧上升,之后变化不明显。NaCl+EGTA处理均呈现下降趋势,在4 h急剧下降,之后变化不明显。在24~48 h,除了对照处理显著降低之外($P < 0.05$),其它3种处理均没有发生明显变化。NaCl+CaCl₂处理始终显著高于其它3种处理($P < 0.05$)。

由图5可知,巴西蕉幼苗叶片中,对照处理的液泡膜Ca²⁺-ATPase活性呈现先上升后下降的趋势,在4 h微上升,在12 h达到峰值,之后显著下降。NaCl处

图4 盐胁迫下巴西蕉叶片质膜Ca²⁺-ATPase活性Fig.4 Ca²⁺-ATPase activities in plasma membrane of the leaf of Brazilian banana seedling under salt stress

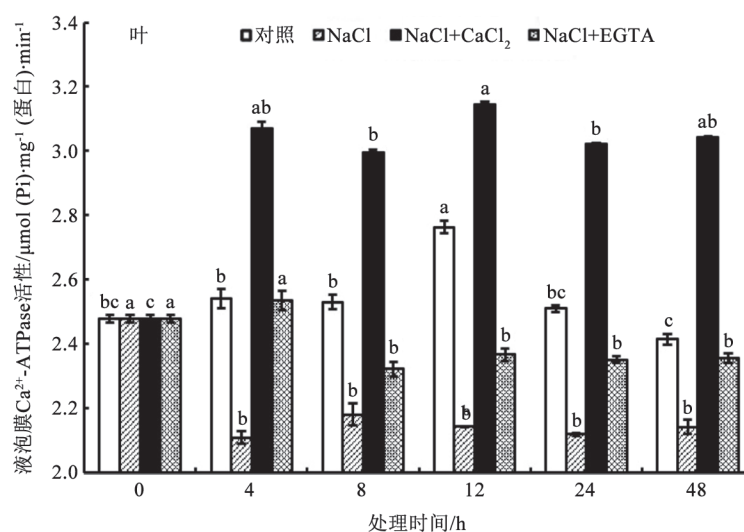


图5 盐胁迫下巴西蕉叶片液泡膜Ca²⁺-ATPase活性

Fig.5 Ca²⁺-ATPase activities in tonoplast membrane of the leaf of Brazilian banana seedling under salt stress

理在4 h显著下降, 之后变化不明显。NaCl+CaCl₂处理呈现双波峰的趋势, 从4 h急剧上升, 在8 h略有下降, 于12 h达到峰值, 之后显著下降。NaCl+EGTA处理先微上升再显著下降最后变化不明显。在4~48 h内, 对照和NaCl+CaCl₂处理在12 h时均达到了峰值。NaCl胁迫下CaCl₂处理始终显著高于其它3种处理($P<0.05$)。

由图6可知, 巴西蕉幼苗叶片, 对照处理的内质网膜的Ca²⁺-ATPase活性在4 h显著上升之后变化不明显。NaCl处理表现的趋势和对照一致。NaCl+CaCl₂处理在4 h 急剧上升, 之后变化趋于平缓。

NaCl+EGTA处理变化均不明显。与对照处理相比, NaCl处理其活性时而大时而小。NaCl+CaCl₂处理始终显著高于其它3种处理($P<0.05$)。NaCl+EGTA处理始终显著低于其它3种处理($P<0.05$)。

由图4~6可知, 在NaCl胁迫下, 巴西蕉幼苗叶片各膜的钙泵活性, CaCl₂处理的显著高于其它3种处理($P<0.5$)。与幼苗根的Ca²⁺-ATPase活性相比, NaCl+CaCl₂处理组在处理4 h时, 各膜钙泵活性均呈显著上升的趋势。表明在NaCl胁迫4 h各膜的Ca²⁺-ATPase活性发生了显著变化。

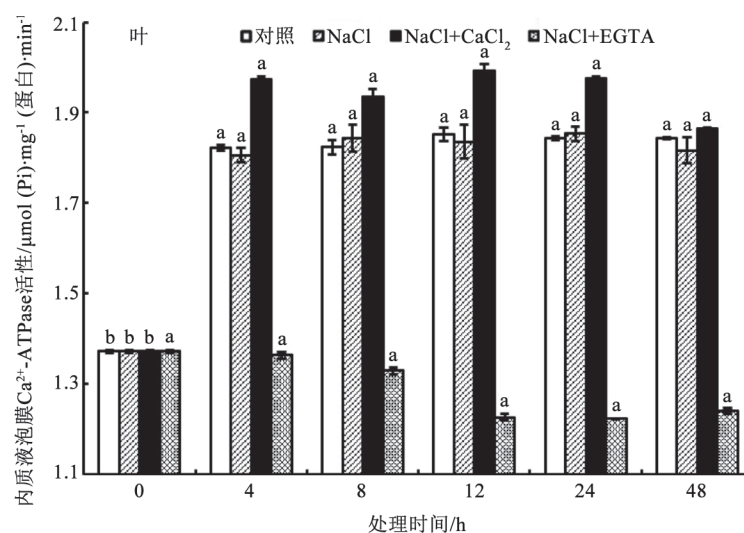


图6 盐胁迫下巴西蕉叶片内质网膜Ca²⁺-ATPase活性

Fig.6 Ca²⁺-ATPase activities in endoplasmic reticulum membrane of the leaf of Brazilian banana seedling under salt stress

讨 论

Ca^{2+} -ATPase几乎存在于植物细胞中所有的膜系统上,包括质膜、液泡膜、内质网膜、线粒体膜、质体和叶绿体膜以及核膜等(White和Broadley 2003)。本试验通过研究巴西蕉幼苗在NaCl胁迫下,质膜、液泡膜、内质网膜的 Ca^{2+} -ATPase活性变化。结果表明,无论是根或叶片在 CaCl_2 处理下其质膜、液泡膜及内质网膜的 Ca^{2+} -ATPase活性都显著高于其它处理。Liu等(2014)研究发现,在增加 Ca^{2+} 浓度的情况下,液泡膜和质膜的 Ca^{2+} -ATPase也随之增加。樊秀彩等(2003)认为这种酶活性的升高可能是钙信使系统对细胞质 Ca^{2+} 浓度升高的一种反馈调控机制,反映出此时细胞膜维持 Ca^{2+} 稳态的能力较强,其中液泡膜及线粒体膜也具有重要的作用。 Ca^{2+} 通过质膜 Ca^{2+} -ATPase酶排出细胞,或经由内质网 Ca^{2+} -ATPase酶,线粒体 Ca^{2+} 单向转运体回收至内质网、线粒体等胞内“钙库”,从而使 Ca^{2+} 浓度降低至静息态水平(卫涛涛2012)。在NaCl胁迫4 h,巴西蕉幼苗无论是叶片或根, CaCl_2 处理其膜的 Ca^{2+} -ATPase活性都发生显著的增加,且各膜的 Ca^{2+} -ATPase活性在4 h是一个重要的转折点。这说明在NaCl胁迫下 CaCl_2 处理能显著提高巴西蕉幼苗的 Ca^{2+} -ATPase活性,保证细胞内 Ca^{2+} 处于相对稳态,盐胁迫诱导的信号转导正常进行,提高了香蕉盐胁迫的适应能力。

目前已发现,钙信号对多种逆境刺激具有应答功能,但在不同逆境下发挥作用的方式是不相同的。因此,加强各种逆境应答反应特异性的研究对于进一步研究钙信号的精确调控具有重要的意义(马贞玉2008)。 Ca^{2+} -ATPase在逆境胁迫中的作用是十分重要的(李裕红等2014)。EGTA能抑制胞外钙离子的吸收,阻止胞外钙离子内流,从而干扰扩气信使系统的正常运转(简令成等2000)。本实验中,巴西蕉幼苗根和叶片在NaCl胁迫下,EGTA处理的 Ca^{2+} -ATPase活性都显著低于对照处理;在NaCl胁迫4~48 h,EGTA处理的各膜 Ca^{2+} -ATPase活性均显著降低。这说明EGTA处理在NaCl胁迫4h大大抑制了 Ca^{2+} -ATPase活性的增加。在各处理下,巴西蕉幼苗不同膜的 Ca^{2+} -ATPase活性不同,无论是根或叶片,它们的质膜和液泡膜的 Ca^{2+} -ATPase活性远远大于内质网膜,这与Vanagas等

(2007)认为质膜 Ca^{2+} -ATPase在总调节胞内钙离子的排出活性比质网膜 Ca^{2+} -ATPase不重要不相符。这说明质膜和液泡膜 Ca^{2+} -ATPase活性主要参与巴西蕉幼苗的 Ca^{2+} 稳态调控。总之,质膜及液泡膜 Ca^{2+} -ATPase是调控巴西蕉胞内 Ca^{2+} 的关键酶,通过提高质膜及液泡膜 Ca^{2+} -ATPase的活性,可以维持细胞内低浓度 Ca^{2+} 的稳态水平。另外,在NaCl胁迫过程中,巴西蕉幼苗的质膜、液泡膜和内质网膜的 Ca^{2+} -ATPase活性变化比较没有规律性,对巴西蕉NaCl胁迫下抗逆性有待更进一步深入研究。

参考文献

- Alexander RT, Beggs MR, Zamani R, Marcussen N, Frische S, Dimke H (2015). Ultrastructural and immunohistochemical localization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4 in Ca^{2+} -transporting epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 309 (7): 604–616
- Boczek T, Lisek M, Ferenc B, Kowalski A, Wiktorska M, Zylinska L (2014). Silencing of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 2 and 3 impairs energy metabolism in differentiating PC12 cells. *Biomed Res Int*, 2014: 735106–735106
- Bonza MC, Michelis MID (2011). The plant Ca^{2+} -ATPase repertoire: biochemical features and physiological functions. *Plant Biol (Stuttg)*, 13 (3): 421–430
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61 (1): 593–620
- Fan XC, Guan JF, Liu CH, Zhang JS (2003). Activity and characters of Ca^{2+} -ATPase during strawberry fruit ripening. *J Fruit Sci*, 20 (2): 99–102 (in Chinese with English abstract) [樊秀彩, 关军锋, 刘崇怀, 张继澍(2003). 草莓果实成熟过程中 Ca^{2+} -ATPase活性变化及酶学特性. *果树学报*, 20 (2): 99–102]
- Gao LP, Wei T (2013). University General Life Science Experiment Tutorial. Beijing: Peking University Press, 185–188 (in Chinese with English abstract) [高丽萍, 魏涛(2013). 大学通用生命科学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 185–188]
- Jensen TP, Buckby LE, Empson RM (2004). Expression of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase family members and associated synaptic proteins in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat. *Dev Brain Res*, 152 (2): 129–136
- Jensen TP, Filoteo AG, Knopfel T, Empson RM (2006). Pre-synaptic plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 2a regulates excitatory synaptic transmission in rat hippocampal CA3. *J Physiol*, 579 (1): 85–99
- Jian LC, Sun LH, Li JH, Wang H, Sun DL, Paul HL (2000). Ca^{2+} -homeostasis differs between plant species with different cold-tolerance at 4°C chilling. *Acta Bot Sin*, 42 (4): 358–366 (in Chinese with English abstract) [简令成, 孙龙华, 李积宏, 王红, 孙德兰, Paul HL (2000). 低温逆境中不同抗寒性植物细胞内 Ca^{2+} 稳定平衡的区别. *植物学报*, 42 (4): 358–366]
- Krebs J (2009). The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing. *Biochim Biophys Acta*, 1793 (6): 979–984
- Li YH, Wu WL, Zhang N (2014). Prokaryotic expression and purifi-

- cation of Ca²⁺-ATPase from aquatic plant eichhorniacrassipes. J Quanzhou Univ, 32 (6): 21–24 (in Chinese with English abstract) [李裕红, 吴文林, 张鼎(2014). 水生植物凤眼莲Ca²⁺-ATPase的原核表达与蛋白纯化. 泉州师范学院学报, 32 (6): 21–24]
- Liu W, Yuan XT, Zhang YY, Xuan YA, Yan YQ (2014). Effects of salt stress and exogenous Ca²⁺ on Na⁺ compartmentalization, ion pump activities of tonoplast and plasma membrane in *Nitraria tangutorum* Bobr. leaves. Acta Physiol Plant, 36 (8): 2183–2193
- Ma ZY (2008). The effect of osmotic stress on calcium channel and Ca²⁺ and Ca²⁺-ATPase in plasma membrane of maize root tip cell [Master's thesis]. Shijiazhuang: Hebei Normal University (in Chinese with English abstract) [马贞玉(2008). 渗透胁迫对玉米幼苗根尖细胞质膜Ca²⁺通道及Ca²⁺-ATPase活性的影响[硕士学位论文]. 石家庄: 河北师范大学]
- Pérez-Alfocea F, Balibrea ME, Santa Cruz A, Estan MT (1996). Agromonomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. Plant Soil, 180 (180): 251–257
- Pottosin II, Schönknecht G (2007). Vacuolar calcium channels. Exp Bot J, 58 (7): 1559–1569
- Sun JW, Zhou W, Liang GQ, Wang XB (2011). Effects of calcium on content of calmodulin activity of Ca²⁺-ATPase and their gene expressions in apple (*Malus pumila* Mill) fruits. Plant Nutr Fert Sci, 17 (2): 425–432 (in Chinese with English abstract) [孙静文, 周卫, 梁国庆, 王秀斌(2011). 钙对苹果果实钙调蛋白含量和Ca²⁺-ATPase活性及其基因表达的影响. 植物营养与肥料学报, 17 (2): 425–432]
- Vanagas L, Rossi RC, Caride AJ, Filoteo AG, Strehler EE, Rossi JP (2007). Plasma membrane calcium pump activity is affected by the membrane protein concentration. Evi-dence for the involvement of the actin cytoskeleton. Biochim Biophys Acta, 1768 (6): 1641–1644
- Wang HB, Su XG, Deng HL, Li YH, Zhang ZQ (2013). Cloning and expression of Ca²⁺-ATPase gene from banana. Guangdong Agric Sci, 40 (19): 146–149 (in Chinese with English abstract) [王海波, 苏新国, 邓鸿铃, 李银花, 张昭其(2013). 香蕉Ca²⁺-ATPase的基因克隆与表达分析. 广东农业科学, 40 (19): 146–149]
- Wang Y (2010). Changes of Ca²⁺ and Ca²⁺-ATPase activities in Cells of *Populus euphratica* and *P. euramericana* under salt and drought stress (Master's Thesis). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [王颖(2010). 盐胁迫和干旱胁迫下胡杨和意大利杨细胞内Ca²⁺和Ca²⁺-ATPase水平的变化(硕士学位论文). 北京: 北京林业大学]
- Wei TT (2012). The plasma membrane calcium ATPase. Acta Biophys Sin, 28 (7): 549–564 (in Chinese with English abstract) [卫涛涛(2012). 质膜钙离子ATP酶. 生物物理学报, 28 (7): 549–564]
- White PJ, Broadley MR (2003). Calcium in plants. Ann Bot, 92 (4): 487–511
- Yang R, Guan XL, Zhang RL, Yang WL, Zheng J, Leng PS (2013). Changes of Ca²⁺ and Ca²⁺-ATPase in the mesophyll cells of *Euryonymus japonicas* 'Cuzhi' under cold stress. Acta Horti Sin, 40 (6): 1139–1152 (in Chinese with English abstract) [杨蕊, 关雪莲, 张睿鹏, 杨文莉, 郑健, 冷平生(2013). 低温胁迫下北海道黄杨叶肉细胞Ca²⁺和Ca²⁺-ATPase的变化. 园艺学报, 40 (6): 1139–1152]
- Zhang JH, Zhang GQ, Liu YP, Huang WD (2006). Cytochemical localization and changes in activity of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in young grape (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) plants during cross adaptation to temperature stresses. Sci Agric Sin, 39 (8): 1617–1625 (in Chinese with English abstract) [张俊环, 张国强, 刘悦萍, 黄卫东(2006). 温度逆境交叉适应过程中葡萄幼苗质膜Ca²⁺-ATPase的细胞化学定位与活性变化. 中国农业科学, 39 (8): 1617–1625]
- Zhang ZS, Li RQ, Wang JB (2001). Effect of Ca²⁺ pretreatment on the Ca²⁺-ATPase activity in the mesophyll cells of pepper seedling under heat stress. J Plant Physiol Mol Biol, 27 (6): 451–454 (in Chinese with English abstract) [张宗申, 利容千, 王建波(2001). Ca²⁺预处理对热胁迫下辣椒叶肉细胞中Ca²⁺-ATPase活性的影响. 植物生理与分子生物学报, 27 (6): 451–454]
- Zhao SC, Sun JW, Wang XB, Wang H, Liang GQ, Zhou W (2008). Effects of cadmium on calmodulin content and Ca²⁺-ATPase activities of maize (*Zea mays*) seedling. Plant Nutr Fert Sci, 14 (2): 264–271 (in Chinese with English abstract) [赵士诚, 孙静文, 王秀斌, 汪洪, 梁国庆, 周卫(2008). 镉对玉米苗中钙调蛋白含量和Ca²⁺-ATPase活性的影响. 植物营养与肥料学报, 14 (2): 264–271]
- Zhou W, Wang H (2007). The physiological and molecular mechanisms of calcium uptake, transport, and metabolism in plants. Chin Bull Bot, 24 (6): 762–778 (in Chinese with English abstract) [周卫, 汪洪(2007). 植物钙吸收、转运及代谢的生理和分子机制. 植物学通报, 24 (6): 762–778]

Changes of Ca²⁺-ATPase activities of part of cell membrane system in Brazilian banana seedling under salt stress

WANG Wen-Chang^{1,2}, QIAO Fei², JIANG Xue-Fei¹, ZHOU Shuang-Yun³, JI Fu-Sang¹, LI Xin-Guo^{1,*}

¹College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou 570228, China; ²Tropical Crops Genetic Resource Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; ³Horticultural Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

Abstract: To study the changes in Ca²⁺-ATPase activities of microsomal membrane under salt stress, the Brazilian banana seedlings were treated with the exogenous CaCl₂ and Ca²⁺ chelating agent EGTA under 60 mmol·L⁻¹ NaCl for 4, 8, 12, 24 and 48 h, and Ca²⁺-ATPase activities of part of cell membrane in leaves and roots were determined. The results showed that Ca²⁺-ATPase activities of plasma membrane, tonoplast membrane and endoplasmic reticulum membrane in roots and leaves were different, and the Ca²⁺-ATPase activity with CaCl₂ treatment was significantly higher than those of other three treatments. Under NaCl stress for 4 h, the Ca²⁺-ATPase activities with CaCl₂ treatment were significantly increased, while the Ca²⁺-ATPase activities with EGTA treatment decreased significantly. The Ca²⁺-ATPase activities of the plasma membrane and tonoplast membrane were much larger than that of the endoplasmic reticulum membrane. These indicated that Ca²⁺-ATPase activity of plasma membrane and tonoplast membrane mainly involved in the regulation of Ca²⁺ homeostasis in Brazilian banana seedlings.

Key words: Brazilian banana seedling; salt stress; Ca²⁺-ATPase activity

Received 2016-03-07 Accepted 2016-06-06

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31260462) and the Hainan University Discipline Construction Project Plan of Western and Central China (Grant No. ZXBHJH-XK008).

*Corresponding author (E-mail: lixinguo13@163.com).