

管 莉, 张阿英. CaM 与 ZmCCaMK 相互作用参与 BR 诱导的玉米叶片抗氧化防护[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 10-15.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.002

CaM 与 ZmCCaMK 相互作用参与 BR 诱导的玉米叶片抗氧化防护

管 莉, 张阿英

(南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以玉米(*Zea mays* L.)为材料,通过酶联免疫法、实时荧光定量 PCR 技术、免疫共沉淀激酶反应以及原生质体瞬时表达体系等方法研究了在油菜素内酯(Brassinosteroids, BR)诱导的玉米叶片抗氧化防护过程中钙调素(Calmodulin, CaM)的作用以及 CaM 和 Ca^{2+} /CaM 依赖的蛋白激酶(*ZmCCaMK*)之间的关系。结果显示:外源 BR 处理显著提高了玉米叶片叶肉细胞原生质体中的 CaM 含量,CaM 拮抗剂的预处理几乎完全抑制了 BR 诱导的抗氧化防护酶活性,表明 CaM 参与了 BR 诱导的抗氧化防护。而且 *ZmCCaMK* 原生质体瞬时表达及瞬时沉默结果显示 *ZmCCaMK* 影响 BR 诱导的 CaM 含量,CaM 拮抗剂的预处理也显著抑制了 BR 诱导的 H_2O_2 的产生、*ZmCCaMK* 基因表达以及激酶活性。说明 BR 诱导产生的 CaM 增强 H_2O_2 的积累,进一步诱导抗氧化防护酶活性增加,并且 CaM 和 *ZmCCaMK* 之间存在互动机制。

关键词: 玉米; 油菜素内酯; 钙调素; 抗氧化酶; H_2O_2 ; *ZmCCaMK*

中图分类号: S513.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0010-06

CaM-ZmCCaMK interaction involved in brassinosteroid-induced antioxidant defense in leaves of maize

GUAN Li, ZHANG A-ying

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), real-time PCR, immunoprecipitation and in-gel kinase assay and protoplast transient expression system were used to investigate the role of calmodulin (CaM) in brassinosteroids (BR)-induced antioxidant defense and the relationship between CaM and Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase (*ZmCCaMK*) in leaves of maize (*Zea mays* L.) plants. The results showed that treatment with BR led to significant increase in the content of CaM in protoplasts of maize plants and pre-treatment with CaM antagonists blocked the activities of antioxidant enzymes induced by BR treatment in leaves of maize, which suggest that CaM is involved in BR-induced antioxidant defense. Moreover, transient expression or transient silencing of *ZmCCaMK* in protoplasts resulted in a significant enhancement or block in the content of CaM induced by BR treatment. Pre-treatment with CaM antagonists significant inhibited the production of H_2O_2 , the expression and the activity of *ZmCCaMK* induced by BR in the leaves of maize. The results suggest that the BR-induced CaM increased H_2O_2 accumulation, increased the activities of antioxidant enzymes, and a cross-talk may exist between CaM and *ZmCCaMK* in BR signaling in the leaves of maize plants.

收稿日期:2014-05-20

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-10-0498)

作者简介:管 莉(1987-),女,吉林白山人,硕士研究生,主要从事植物生理学研究。(Tel)18260081503;(E-mail)guanli9487@163.com

通讯作者:张阿英,(Tel)025-84396372;(E-mail)ayzhang@njau.edu.cn

Key words: maize (*Zea mays* L.); brassinosteroid; calmodulin; antioxidant enzyme; hydrogen peroxide; ZmCCaMK

油菜素内酯(Brassinosteroids, BR)作为一种新型甾醇类植物激素,参与并调节植物生长发育以及对胁迫响应过程^[1-3]。许多研究结果表明,BR可以通过提高植物的抗氧化防护酶活性来增强植物对胁迫的耐受能力^[4-5],活性氧、促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)^[5-6]、钙调素依赖的蛋白激酶(Calcium-calmodulin dependent protein kinase, ZmCCaMK)等都参与BR诱导的抗氧化防护,然而关于BR诱导植物抗氧化防护的详细机理还不十分清楚。

近些年一些研究结果表明,钙调素(Calmodulin, CaM)也参与了植物对多种环境刺激和胁迫的响应机制,如盐胁迫、干旱胁迫等^[7-8]。Desikan等^[9]研究发现外源H₂O₂可以诱导CaM基因的表达。外源脱落酸(Abscissic acid, ABA)、H₂O₂或者水分胁迫都可以显著提高玉米叶片中CaM含量,而且CaM抑制剂试验结果也表明CaM参与ABA诱导的抗氧化防护^[10]。但CaM是否参与BR诱导的抗氧化防护过程还不清楚。因此,本试验以玉米农大108为材料,研究CaM在BR诱导的抗氧化防护中的作用,并且进一步研究CaM和ZmCCaMK在BR诱导的抗氧化防护过程中的关系,以期深入了解BR诱导抗氧化防护机制,为进一步了解植物在抗逆过程中的响应机理提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

玉米农大108购自中国种子公司,瞬时表达载体pXZ-ZmCCaMK由本实验室马芳芳构建,ZmCCaMK抗体由金斯瑞公司制备。

PEG4000、甘露糖醇、三氟乙酸、KI、2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)、N-(6-氨基己烷基)-5-氯-1-萘黄胺[N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulphonamide hydrochloride, W7]和三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)为Sigma公司产品;离析酶R-10、纤维素酶R-10为日本Yakult Honsha公司产品;反转试剂盒、定量试剂盒、ELISA购自TaKaRa公司;RNA干扰试剂盒购自Promega公司。

1.2 试验方法

1.2.1 植株培养和处理

将玉米幼苗置于光照恒温箱中(昼夜温度28℃/22℃,每天光照14h,相对湿度60%)培养7d。然后,挑选长势一致的玉米幼苗,参照Ma等的方法^[11],用CaM拮抗剂W7(200 μmol/L)、TFP(100 μmol/L)预处理4h,再用BR处理30min,取第2片叶子并置于液氮中备用。另外,将玉米种子置于蛭石-泥炭土(1:1)中,并在暗培养箱中培养,当第2片叶高出第1片叶10~15cm时,从基部剪取第2片叶,用于玉米原生质体的提取。

1.2.2 dsRNA的体外转录合成 参照Ma等的方法^[11]合成ZmCCaMK的dsRNA。

1.2.3 玉米原生质体的分离和转化 参照Zhu等的方法^[4],提取玉米原生质体。玉米原生质体的转化是采用聚乙二醇(40% PEG4000)融合法。将高纯度的重组质粒100 μg ubi-YFP-ZmCCaMK(以空载ubi-YFP为对照)或者150 μg dsRNA(以双蒸水为对照)加入到1ml原生质体中,再加入1.1ml PEG溶液(0.6 mol/L甘露醇,40% PEG4000,0.1 mol/L CaCl₂),轻轻混匀,25℃静置13~15min;加入4.4ml W5溶液(125 mmol/L CaCl₂,154 mmol/L NaCl,5 mmol/L KCl,2 mmol/L MES,pH 5.7)混匀,1 000 g离心3min,弃上清;加1ml培养液(0.6 mol/L甘露醇,4 mmol/L MES,4 mmol/L KCl,pH 5.7),25℃培养过夜;用10 nmol/L BR处理30min后,收集玉米原生质体,以测定CaM含量。

1.2.4 叶片总RNA的提取及cDNA的制备 将0.1g玉米叶片用液氮充分研磨,并溶于RNA提取试剂Trizol中,然后参照Ding等的方法^[12]进行总RNA的提取及RNA浓度和纯度的检测。最后,将提取得到的RNA按照反转试剂盒的说明将RNA反转录成cDNA。

1.2.5 定量RT-PCR及数据处理 应用Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System对ZmCCaMK基因进行相对定量RT-PCR分析;采用SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒,以ZmACTIN为内参引物。ZmCCaMK(DQ403196)的引物序列:5'-CTCAAGC-CCGAGAACTGCC-3'和5'-TGGCAGCCGAGACATC-C-3';ZmACTIN(J01238)的引物序列:5'-GTTTCCT-GGGATTGCCGAT-3'和5'-TCTGCTGCTGAAAAGT-GCTGAG-3'。反应体系和反应程序参照试剂盒说

明。每个样品重复 3 次,取平均值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算待测基因的相对表达量,其中,基因在各处理 0 min 时的相对表达量设定为 1.0。

1.2.6 免疫沉淀和激酶凝胶反应 将处理后的叶片用液氮研磨成粉末,加入 1 ml 蛋白质提取液[100 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) pH 7.5, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 5 mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA), 10 mmol/L 二硫苏糖醇, 10 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mmol/L NaF, 50 mmol/L β -磷酸甘油, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮抑酶肽(Leupeptin), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶(Aprotinin), 5% 甘油], 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 0.5 h, 取上清, 采用 Bradford 方法^[13] 计算蛋白质含量, 分装并冻于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 待用。免疫沉淀和激酶凝胶反应步骤参照 Ma 等的方法^[11]。将得到的 X 光片用 Quantity One 软件进行量化处理, 将对照点设定为 1.0, 其余各处理点的相对值由处理点的数值除以对照的值。

1.2.7 酶联免疫法(ELISA)测定 CaM 含量 收集过夜培养后的原生质体, 加入 2 倍体积的预冷提取液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L PMSF, 20 mmol/L NaHSO_4 , 0.15 mol/L NaCl), 涡旋震荡 2 min(可用超声波破碎); 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 0.5 h, 参照 ELISA 试剂盒(TaKaRa 公司产品)方法测定原生质体中 CaM 含量, 钙调素含量以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 表示(以蛋白质计)。

1.2.8 H_2O_2 含量的测定 H_2O_2 含量的测定参照张超强等的方法^[14]。0.5 g 的玉米叶片, 加入预冷的 4 ml 三氟乙酸研磨, 12 000 g 离心 30 min; 取 0.5 ml 上清液, 加入等体积 10 mmol/L 磷酸缓冲液和 2 倍体积的 1 mol/L KI, 在 390 nm 处测定吸光值, H_2O_2 含量以 ng/g 表示(以鲜质量计)。

1.2.9 抗氧化酶的活性测定 超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性测定均参照 Zhang 等的方法^[5]。

1.2.10 数据分析 每个处理重复 5 次, 数据统计采用 SPSS 软件, 用 Duncan's 法分析差异显著性。

2 结果

2.1 外源 BR 诱导对玉米叶片叶肉细胞原生质体 CaM 含量的影响

为了研究外源 BR 对玉米叶片原生质体中 CaM 含量的影响, 用 10 nmol/L BR 处理分离得到的玉米

叶片原生质体, 并测定 CaM 含量。结果(图 1)表明: 与对照相比, 外源 BR 处理显著提高了玉米叶片原生质体中 CaM 含量, CaM 含量在 BR 处理 30 min 时达最大值, 增加了 2.8 倍, 随后开始下降, 到 60 min 时下降到正常水平。

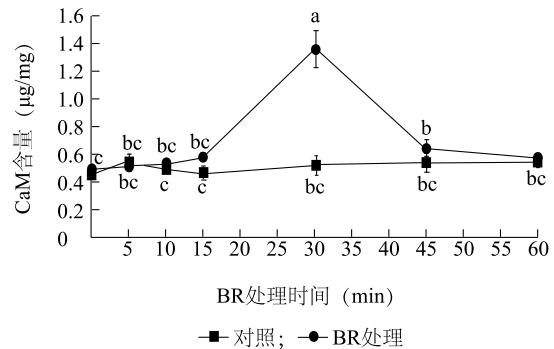


图 1 10 nmol/L 油菜素内酯(BR)处理不同时间后玉米叶片叶肉细胞原生质体钙调素(CaM)含量的变化

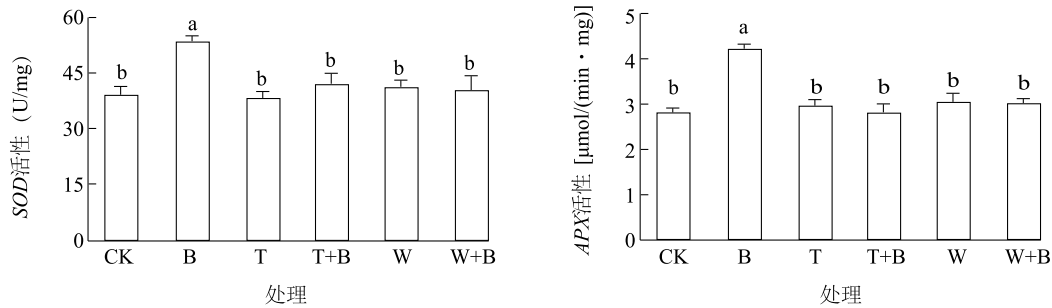
Fig. 1 Time course of calmodulin (CaM) content in maize mesophyll protoplasts treated with 10 nmol/L brassinosteroids (BR)

2.2 CaM 参与 BR 诱导的抗氧化防护

为了确定 CaM 是否参与 BR 诱导的抗氧化防护过程, 玉米植株预先用 CaM 拮抗剂处理 4 h, 再用 10 nmol/L BR 处理 30 min(水处理为对照), 测定抗氧化防护酶 SOD、APX 的活性以及 H_2O_2 含量的变化。结果(图 2)显示 CaM 拮抗剂几乎完全抑制了 BR 诱导的玉米叶片中抗氧化防护酶 SOD、APX 的活性, 这表明 CaM 参与了 BR 诱导的玉米叶片的抗氧化防护。

2.3 CaM 对 BR 诱导的 *ZmCCaMK* 基因表达以及激酶活性、 H_2O_2 含量的影响

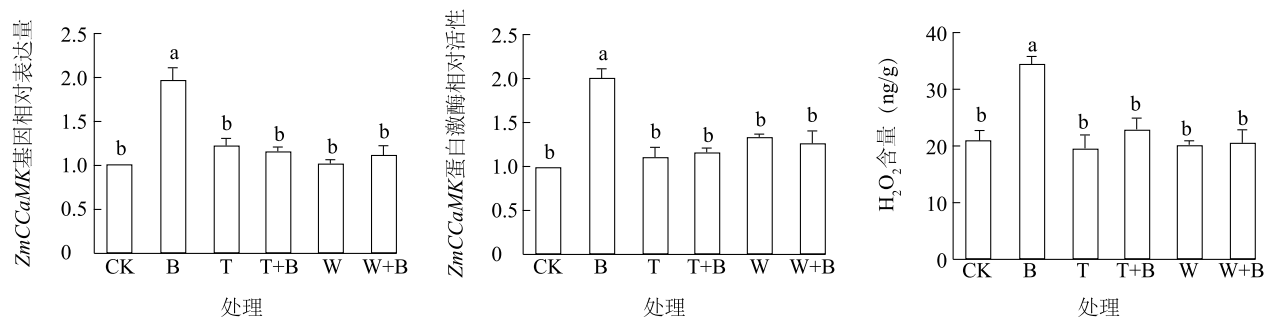
为研究 CaM 和 *ZmCCaMK* 在 BR 诱导的抗氧化防护过程中的关系, 首先用 CaM 拮抗剂 W7 和 TFP 预处理玉米幼苗, 再通过荧光定量 PCR 技术测定玉米叶片中 *ZmCCaMK* 基因表达量, 同时用凝胶激酶反应测定 *ZmCCaMK* 的激酶活性。结果表明: CaM 抑制剂的预处理能显著降低 BR 诱导的 *ZmCCaMK* 基因表达和激酶活性增加, 而 W7 和 TFP 本身对其没有影响(图 3)。此外, CaM 拮抗剂 W7 和 TFP 预处理也显著抑制了 BR 诱导的 H_2O_2 积累。这些结果说明 CaM 参与 BR 诱导的 *ZmCCaMK* 活化及 H_2O_2 积累。



CK:对照;B:BR处理30 min;T:TFP处理4 h;T+B:先用TFP处理4 h,再用BR处理30 min;W:W7处理4 h;W+B:先用W7处理4 h,再用BR处理30 min。

图2 CaM拮抗剂TFP和W7预处理对BR诱导的抗氧化防护酶SOD和APX的影响

Fig.2 Effects of pretreatment with CaM antagonists of TFP and W7 on BR-induced antioxidant enzymes SOD and APX



各处理见图2注。

图3 钙调素拮抗剂预处理对BR诱导的玉米叶片中ZmCCaMK基因表达和激酶活性、H₂O₂含量的影响

Fig.3 The effects of pretreatment with CaM antagonists on ZmCCaMK expression and the activities of ZmCCaMK, and the content of H₂O₂

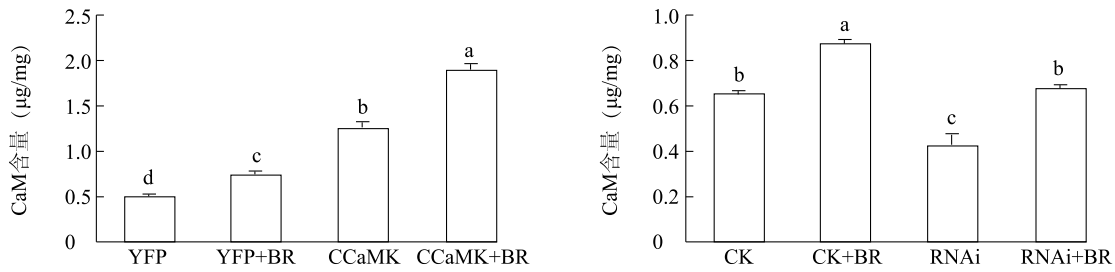
2.4 瞬时表达和瞬时沉默ZmCCaMK基因对BR诱导的原生质体中CaM含量的影响

采用原生质体瞬时表达及瞬时沉默体系,瞬时表达及瞬时沉默ZmCCaMK基因,并经BR处理30 min,以转化空载为对照,然后用酶联免疫法测定样品中CaM含量。结果(图4)表明:瞬时表达ZmCCaMK基因后,CaM含量明显增加,并且BR处理后仍有部分增加;瞬时沉默ZmCCaMK基因后,CaM含量明显减少,且BR处理也仅有略微增加。说明ZmCCaMK也参与调节玉米叶片中BR诱导的CaM含量。

3 讨论

植物在整个生长发育过程中会受到各种不良环境的影响,如盐胁迫、干旱胁迫等,这些非生物胁迫

主要是干扰植物细胞中活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产生和清除之间的平衡,从而导致植物细胞遭受氧化胁迫。在正常条件下,ROS的生成和清除处在一定的平衡状态,不会对细胞造成损伤,但当处于环境胁迫时,植物体内ROS急剧积累而使细胞受到氧化胁迫^[15]。然而植物在长期的进化中为了生存,在受到环境胁迫时,可以通过改变细胞代谢及诱导多种防御机制来响应环境胁迫^[16]。越来越多的研究表明,植物激素BR在这一过程中起着十分重要的作用。Zhang等^[5]的研究结果表明BR能诱导超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等抗氧化防护酶活性上调,提高清除ROS的能力,从而缓解干旱胁迫对植物造成的氧化损伤。Liu等^[17]的研究结果表明BR可以诱导抗氧化防护酶活性上调,从而减轻低温对高山离子芥造



YFP:转化空载;YFP+BR:转化空载+BR处理;CcCaMK:瞬时表达 *ZmCCaMK*;CcCaMK+BR:瞬时表达 *ZmCCaMK*+BR处理;CK:转化 H_2O_2 ;CK+BR:转化 H_2O_2 +BR处理;RNAi:瞬时沉默 *ZmCCaMK*;RNAi+BR:瞬时沉默 *ZmCCaMK*+BR处理。

图4 瞬时表达及瞬时沉默 *ZmCCaMK* 对 BR 诱导的原生质体 CaM 含量的影响

Fig.4 The content of CaM exposed to BR treatment in the protoplasts transiently expressing or transiently silencing *ZmCCaMK*

成的氧化损伤。但对 BR 诱导的抗氧化防护机理的研究报道较少。本研究发现, BR 可以显著提高玉米叶片叶肉细胞原生质体的 CaM 含量, 同时 CaM 拮抗剂试验结果表明, CaM 参与了 BR 诱导的抗氧化防护酶活性的提高以及 H_2O_2 的积累。这表明 BR 诱导的 CaM 影响 H_2O_2 的积累, 进而提高了抗氧化防护酶 SOD 和 APX 活性。

CaM 和 *ZmCCaMK* 都参与 BR 诱导的抗氧化防护过程。为研究在 BR 信号通路中它们之间的相互关系, 本研究首先进行了抑制剂试验, 结果表明 CaM 参与 BR 诱导的 *ZmCCaMK* 活化。为进一步研究 CaM 和 *ZmCCaMK* 在 BR 信号转导中的关系, 我们借助玉米原生质体瞬时表达及瞬时沉默体系瞬时表达及瞬时沉默 *ZmCCaMK* 基因, 发现 *ZmCCaMK* 也参与并调控玉米叶片中 BR 诱导下 CaM 的含量变化。这表明 BR 可以诱导 CaM, 进而激活 *ZmCCaMK*, 同时 *ZmCCaMK* 也可以反过来影响 BR 诱导的 CaM 含量。近年来越来越多的研究结果表明, CaM 和 H_2O_2 等信号分子之间存在一个交叉对话机制^[10,18], 因此推测 CaM 和 *ZmCCaMK* 在 BR 诱导的抗氧化防护过程中可能存在这一个交叉对话机制。

综上所述, CaM 在 BR 诱导的抗氧化防护过程中具有重要的作用, 并且 CaM 和 *ZmCCaMK* 之间存在一个交叉对话机制, 这对于深入研究 BR 调控植物的抗逆应答反应机制提供了理论依据。

参考文献:

[1] 阮英慧, 董守坤, 刘丽君, 等. 干旱胁迫下油菜素内酯对大豆花

期生理特性的影响 [J]. 作物杂志, 2011, 6: 33-37.

[2] 曹云英, 赵 华. 高温胁迫下油菜素内酯对水稻幼苗的保护作用 [J]. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 525-529.

[3] 张林青. 油菜素内酯对盐胁迫下番茄幼苗生理指标的影响 [J]. 北方园艺, 2013 (1): 1-3.

[4] ZHU Y, ZUO M X, LIANG Y L, et al. MAP65-1a positively regulates H_2O_2 amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defence in maize [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(12): 3787-3802.

[5] ZHANG A Y, ZHANG J, YE N H, et al. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H_2O_2 in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61 (15): 4399-4411.

[6] XIA X J, WANG Y J, ZHOU Y H, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber [J]. Plant Physiology, 2009, 150(2): 801-814.

[7] 张云霞, 石 勇, 王瑞刚, 等. 初始盐胁迫下 ABA 与 CaM 对胡杨叶片气体交换的调控 [J]. 林业科学, 2008, 44(1): 57-64.

[8] 谷俊涛, 郭秀林. 水分胁迫下钙, 钙调素对小麦幼苗生长及过氧化物酶同工酶的影响 [J]. 华北农学报, 2001, 16(3): 62-67.

[9] DESIKAN R, SOHEILA A H, HANCOCK J T, et al. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress [J]. Plant Physiology, 2001, 127(1): 159-172.

[10] HU X L, JIANG M Y, ZHANG J H, et al. Calcium - calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H_2O_2 production in leaves of maize (*Zea mays*) plants [J]. New Phytologist, 2007, 173 (1): 27-38.

[11] MA F F, LU R, LIU H Y, et al. Nitric oxide-activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase regulates the abscisic acid-in-

- duced antioxidant defence in maize [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(13): 4835-4847.
- [12] DING Y F, CAO J M, NI L, et al. ZmCPK11 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(4): 871-884.
- [13] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [14] 张超强,杨颖丽,王 莱,等. 盐胁迫对小麦幼苗叶片 H_2O_2 产生和抗氧化酶活性的影响[J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 2007, 43(1): 71-75.
- [15] FRYER M J, ANDREWS J R, OXBOROUGH K, et al. Relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport, and active O_2 metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature [J]. Plant Physiology, 1998, 116(2): 571-580.
- [16] BOHNERT H J, JENSEN R G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants [J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(3): 89-97.
- [17] LIU Y J, ZHAO Z G, SI J, et al. Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* [J]. Plant Growth Regulation, 2009, 59(3): 207-214.
- [18] HU X L, WANG W, LI C Q, et al. Cross-talks between Ca^{2+} /CaM and H_2O_2 in abscisic acid-induced antioxidant defense in leaves of maize plants exposed to water stress [J]. Plant Growth Regulation, 2008, 55(3): 183-198.

(责任编辑:张震林)