

技术与方法 Techniques and Methods

荧光探针检测娃娃菜组织钙离子的条件优化

夏伦港^{1,3}, 赵雅楠¹, 任成斌¹, 张也¹, 李嘉靖¹, 李雯琳¹, 胡琳莉^{1,2,*}, 郁继华^{1,2,*}¹甘肃农业大学园艺学院, 兰州730070²甘肃农业大学甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 兰州730070³华中农业大学园艺林学学院, 武汉430070

*共同通信作者: 胡琳莉(hull@gsau.edu.cn)、郁继华(yujihua@gsau.edu.cn)

摘要: 植物体内Ca²⁺含量不足是引起娃娃菜干烧心病的主要原因之一, 为了探究温度对娃娃菜幼苗Ca²⁺吸收及分布的影响, 本研究以娃娃菜幼苗叶片及根系组织为试验材料, 将Ca²⁺荧光探针Fluo-3/AM载入娃娃菜细胞中, 并结合激光扫描共聚焦显微镜技术, 先优化荧光探针检测娃娃菜叶片及根系胞质游离Ca²⁺的测定方法, 然后应用优化的测定方法研究不同温度对娃娃菜幼苗Ca²⁺吸收及分布的影响。结果表明, 采用20 μmol·L⁻¹的Ca²⁺荧光指示剂Fluo-3/AM装载, 依次进行低温4°C加载90 min、25°C去酯化90 min, 可获得较为理想的娃娃菜胞质游离Ca²⁺染色结果。不同温度处理7 d后, 高温胁迫下(35°C/20°C, 昼/夜)娃娃菜叶片中Ca²⁺含量与适宜温度下(25°C/18°C, 昼/夜)无明显差异, 低温胁迫下(10°C/5°C, 昼/夜)叶片组织Ca²⁺含量明显高于适宜温度; 根尖组织中Ca²⁺含量在三个温度处理下无明显差异。该试验方法可用于检测娃娃菜胞质游离Ca²⁺的变化, 为研究娃娃菜胞内钙信号变化及选育抗干烧心品种提供技术基础。

关键词: 娃娃菜; Ca²⁺吸收; 荧光探针; 温度胁迫

Optimization of conditions for the determination of calcium ion in mini Chinese cabbage tissues by fluorescent probe

XIA Lungang^{1,3}, ZHAO Yanan¹, REN Chengbin¹, ZHANG Ye¹, LI Jiajing¹, LI Wenlin¹, HU Linli^{1,2,*}, YU Jihua^{1,2,*}¹College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China²Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China³College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

*Co-corresponding authors: Hu LL (hull@gsau.edu.cn), Yu JH (yujihua@gsau.edu.cn)

Abstract: Insufficient calcium ion (Ca²⁺) in plants is one of the main reasons for tipburn occurrence in mini Chinese cabbage. The leaf and root of mini Chinese cabbage seedlings were used as test materials to explore the effect of temperature on Ca²⁺ absorption and distribution. The Ca²⁺ fluorescent probe Fluo-3/MA was loaded into mini Chinese cabbage cells, combined with laser confocal scanning microscopy technology, the fluorescence probe method of detecting the free Ca²⁺ in leaf and root was firstly optimized. Then the optimized method was applied to study the influence of different temperatures on Ca²⁺ absorption and distribution in mini Chinese cabbage seedlings. The results showed that the 20 μmol·L⁻¹ calcium ion fluorescent in-

收稿 2020-12-02 修定 2021-03-23

资助 甘肃农业大学大学生创新创业计划(201912044)、中央引导地方科技发展专项资金(ZCYD-2020-5)、甘肃农业大学公招博士科研启动基金(GSAU-RCZX201713)和甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金(GSAU-STS-2018-32)。

indicator Fluo-3/AM was loaded, followed by loading at 4°C for 90 min and de-esterification at 25°C for 90 min, an ideal Ca^{2+} staining result of mini Chinese cabbage could be obtained. After treated with different temperatures for 7 days, the calcium ion content of leaves under high temperature stress (35°C/20°C, day/night) had no obvious difference with that under suitable temperature (25°C/18°C, day/night), and the calcium ion content of leaf under low temperature stress (10°C/5°C, day/night) was significantly higher than that under the suitable temperature. The calcium ion content in the root tip tissue had no obvious difference among the three temperature treatments. The optimized method can be used to detect the change of free calcium ions in the cytoplasm of mini Chinese cabbage tissues, and it will provide a technical basis for the study of changes in intracellular calcium signal and the breeding of tipburn resistant varieties of mini Chinese cabbage.

Key words: mini Chinese cabbage; Ca^{2+} absorption; fluorescent probe; temperature stress

娃娃菜(*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)是十字花科芸薹属白菜亚种的一种袖珍型小株白菜,作为兰州高原夏菜主栽品种之一,其种植规模逐年扩大。干烧心问题在娃娃菜生产中普遍存在,严重影响其产量、品质和效益,成为制约娃娃菜产业发展的主要因素之一。据调查研究表明,娃娃菜生产中存在夏茬的干烧心发病情况较春秋茬严重的现象(董吉德等2019),夏茬温度较春秋茬高,推测温度胁迫与娃娃菜 Ca^{2+} 吸收转运存在一定关系。

钙元素在维持植物细胞壁的结构稳定性中起着重要的作用,一方面以果胶酸钙的形式在细胞壁结构中起粘合剂的作用,另一方面参与细胞壁合成和降解有关酶活性的调节,而大白菜干烧心的发生与细胞壁结构和功能的变化直接相关(缪颖等2000)。细胞内 Ca^{2+} 作为第二信使来调节植物生长、发育、抗逆等生理反应(张和臣等2007;余晓丛等2012;贾如等2014;Peng等2016)。尤其是胞质中的 Ca^{2+} 对植物生长发育产生巨大影响,因此,准确测定娃娃菜胞质 Ca^{2+} 的浓度变化,对了解钙参与娃娃菜信号转导及娃娃菜干烧心病机理具有重要意义。

植物细胞内 Ca^{2+} 的测定有多种方法(张国增等2010),先用 Ca^{2+} 荧光探针标记细胞、再用激光扫描共聚焦显微镜测定 Ca^{2+} 动态变化是广泛应用的方法之一。 Ca^{2+} 荧光指示剂Fluo-3/AM是一种典型的单波长指示剂(Gryniewicz等1985;Minta等1989),可用激光扫描共聚焦显微镜观测胞内 Ca^{2+} 含量及分布,在单波长条件下, Ca^{2+} 结合后会产生荧光强度的变化,荧光强度与胞内游离 Ca^{2+} 浓度呈现正相

关(张洪等2010;余晓丛等2013;樊慧梅等2012;胡振妍等2016)。

目前关于娃娃菜胞质 Ca^{2+} 变化的检测方法尚未见报道。本研究在前人研究基础上,利用适温繁育法探索并优化娃娃菜细胞胞质游离 Ca^{2+} 检测方法,并检测温度胁迫下娃娃菜叶片细胞 Ca^{2+} 含量及分布情况,旨在为研究温度胁迫下娃娃菜胞内钙信号发生作用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与方法

试验在甘肃农业大学农科楼实验室以及伏羲堂共聚焦显微镜实验室完成。供试娃娃菜(*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*)品种为‘福瑞娃娃菜’,栽培基质为甘肃绿能有限公司与甘肃农业大学园艺学院生产的商品基质。采用穴盘育苗的方法,在人工气候箱中,待娃娃菜幼苗长至两叶一心时进行不同温度处理,其他环境条件保持一致,光周期为12 h/12 h,光照强度为 $375 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。处理7 d后,取娃娃菜幼苗叶片及根系组织进行 Ca^{2+} 荧光检测,试验设置3次重复。

1.2 试验设计

试验共设置4个加载(4°C)和去酯化(25°C)处理组合,分别为60 min加载,60 min去酯化;60 min加载,90 min去酯化;90 min加载,60 min去酯化;90 min加载,90 min去酯化(表1)。试验设置3种温度处理,分别为高温胁迫35°C/20°C(昼/夜)、低温胁迫10°C/5°C(昼/夜)、适宜温度25°C/18°C(昼/夜)(表2)。

表1 Ca²⁺荧光探针加载与去酯化时间
Table 1 The loading and de-esterification time of Ca²⁺ fluorescence probe

加载时间/min	去酯化时间/min
60	60
60	90
90	60
90	90

表2 温度处理试验设计
Table 2 Experiment design for different temperate treatments

处理	昼温/°C	夜温/°C
适温	25	18
高温	35	20
低温	10	5

1.3 检测方法

配制HEPES缓冲液, 将Ca²⁺荧光指示剂Fluo-3/AM用HEPES缓冲液稀释至20 μmol·L⁻¹。切取1 cm²的娃娃菜叶片和1 cm长的根尖作为样品进行试验, 将样品放入外层包有锡箔纸的离心管中, 加入Ca²⁺荧光指示剂Fluo-3/AM, 在避光条件下放入低温培养箱中4°C加载一定时间后用配制的HEPES缓冲液洗涤3次, 再加入HEPES缓冲液放入25°C恒温培养箱中去酯化一定时间。利用激光扫描共聚焦显微镜(卡尔蔡司LSM800, 德国)观察样品, 以氩光为激发光源, 激发光波长为488 nm, 发射光波长选取范围是505~530 nm, 所有处理均在统一参数下进行拍摄。在放大10倍情况下选取染色成功的娃娃菜细胞进行观察, 通过计算机控制扫描和数据采集系统, 对样本Ca²⁺荧光强度和分布进行高分辨图像记录(周丽华和黄光文2005)。

2 实验结果

2.1 孵育温度和时间对染色效果的影响

试验发现, 叶片组织Ca²⁺在荧光指示剂4°C加载90 min, 25°C去酯化90 min时着色最为明显(图1-D), 在此种情况下能获得最佳染色图像, 即娃娃菜叶片背景着色较浅和所观察的娃娃菜细胞着色

较明显。在细胞间隙存在明显的细胞间荧光指示剂累积, 染色不均匀情况。60 min加载, 90 min去酯化时Ca²⁺存在少量聚集, 但是细胞的染色仅存在于间隙(图1-B)。90 min加载, 60 min去酯化时染色过于明显, 胞间聚集量太多, 背景过于明亮, 不利于对比含量的差异(图1-C)。

如图1所示, 根系染色加载时间90 min时, 去酯化时间长短对于结果影响不明显(图1-G和H)。但在荧光指示剂4°C加载90 min, 25°C去酯化90 min时对娃娃菜根系着色最为明显(图1-H)。在该处理下能获得最佳染色图像, 即娃娃菜根系背景着色较浅和所观察的娃娃菜细胞着色较深。在加载时间短的情况下(图1-E), 荧光十分集中且发光值极大。

2.2 温度胁迫对娃娃菜叶片和根系细胞内Ca²⁺荧光分布影响

在建立4°C、90 min加载结合25°C、90 min去酯化的优化条件下, 以适宜温度25°C/18°C (昼/夜)下的娃娃菜叶片和根尖组织为对照, 利用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察低温10°C/5°C (昼/夜)胁迫和高温35°C/20°C (昼/夜)胁迫下娃娃菜的叶片和根系细胞内游离钙分布。

结果显示, 多数植物活细胞胞质静息态的自由Ca²⁺浓度处于较低水平, 主要分布在细胞壁和细胞膜处(图2)。在根系组织中, 植物受到温度胁迫后Ca²⁺的含量无变化。在叶片中, 高温胁迫的情况下, 无论叶片的正面还是背面, 对于Ca²⁺含量影响均不明显; 但在低温胁迫时, 无论叶片的正面还是背面, 叶片组织胞内Ca²⁺含量会上升到较高水平, 使其叶片大量聚积Ca²⁺。

3 讨论

在利用荧光指示剂结合共聚焦显微镜研究细胞内游离Ca²⁺的浓度及其变化特点时, Ca²⁺荧光指示剂装载的成功与否是实验成败的关键之一。酯化形式的Ca²⁺荧光指示剂导入植物细胞时, 常因细胞壁中含有大量的酯酶而使酯化的指示剂难以成功装载(余晓丛等2013)。为使荧光指示剂探针Fluo-3/AM可以顺利进入娃娃菜细胞内, 本试验采用目前在植物上广泛运用的避光条件下低温结合室温孵育法, 选择在低温4°C加载荧光指示剂, 适

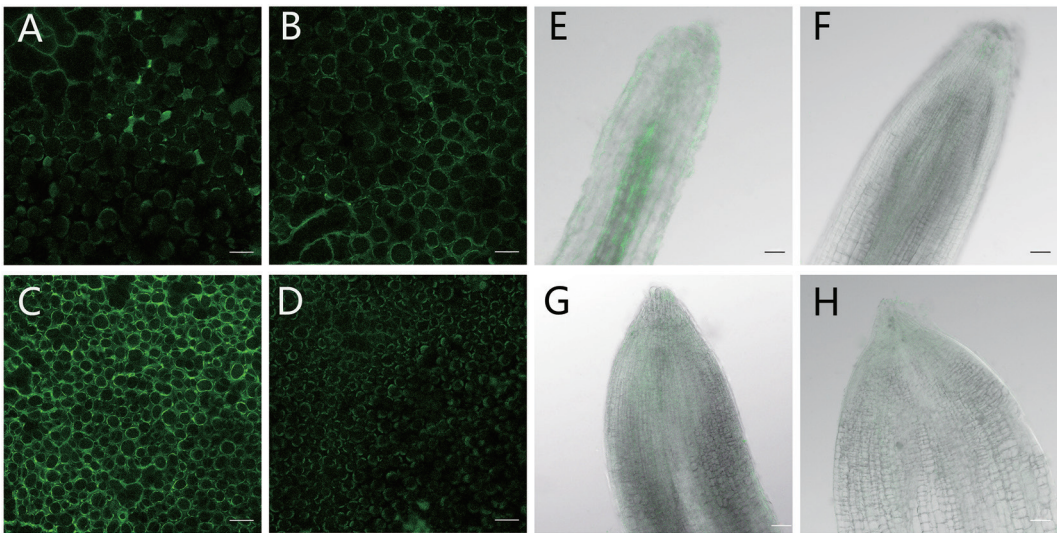


图1 不同加载和去酯化时间对娃娃菜叶片和根系Ca²⁺荧光探针染色结果的影响
Fig. 1 Effects of different loading and de-esterification times on the staining results of Ca²⁺ fluorescent probes in leaf and root of mini Chinese cabbage

A~D为娃娃菜叶片组织; E~H为娃娃菜根系组织。其中A和E: 60 min加载, 60 min去酯化; B和F: 60 min加载, 90 min去酯化; C和G: 90 min加载, 60 min去酯化; D和H: 90 min加载, 90 min去酯化。图中标尺=50 μm, 图2同此。

宜温度25℃去酯化, 有效避免去酯化不完全的荧光染料在细胞或细胞器中的聚集, 且在试验过程中如能做好黑暗处理并及时检测, 未发现有荧光猝灭现象。不仅Ca²⁺荧光指示剂加载和去酯化的温度会影响实验的成败, 时间也是其成败的关键因素之一。在低温条件下的加载时间太短, 娃娃菜的细胞着色不明显, 在室温条件的去酯化时间太短又不能使染料完全去酯化, 不利于激光扫描共聚焦显微镜照相观察。在加载时间足够, 但是去酯化时间不足时会导致过多加载指示剂在细胞间聚集, 产生大量荧光。

已有研究表明降低温度可以减少干烧心病发生(孙秀峰2005), 此试验结果显示温度胁迫会影响娃娃菜幼苗细胞游离Ca²⁺的含量, 且表现为低温胁迫时Ca²⁺含量显著高于适宜温度, 造成这一现象的原因可能是娃娃菜幼苗在感受到低温刺激后, 激活了Ca²⁺信号通路, 调控了与Ca²⁺结合或转运相关基因的表达, 进而促进了植株对Ca²⁺的吸收与运输。Su等(2019)的研究结果显示, 提高抗性基因*BrC-RT2*表达后叶片中Ca²⁺含量显著增加, 这一结果与试验中低温处理后结果相同, 推测低温胁迫会促

进该基因的表达。

综上所述, 采用 20 μmol·L⁻¹的Ca²⁺荧光指示剂 Fluo-3/AM作为探针, 在低温4℃加载90 min、25℃去酯化90 min, 可获得较为理想的娃娃菜组织Ca²⁺染色结果。此结果为进一步研究娃娃菜中Ca²⁺含量及分布提供技术参考。低温胁迫下娃娃菜叶片组织细胞游离Ca²⁺的荧光显著增强, 此结论为进一步研究娃娃菜干烧心病与温度的关系提供技术参考, 并为后期进一步研究培育抗干烧心品种提供一定的技术支持。

参考文献(References)

Dong JD, Fu JP, Chen GQ, et al (2019). Studies on epidemiological laws and incidence factor of tipburn in baby Chinese cabbage. *Chin Veget*, (4): 60–65 (in Chinese with English abstract) [董吉德, 付江鹏, 陈广泉等(2019). 娃娃菜干烧心病流行规律及发病因子调查研究. *中国蔬菜*, (4): 60–65]

Fan HM, Qiu JF, Song ZF, et al (2012). Principle of laser scanning confocal microscope and its application in botany. *J Henan Agric Sci*, 41: 9–11 (in Chinese with English abstract) [樊慧梅, 仇建飞, 宋志峰等(2012). 激光扫描共聚焦显微镜的原理及其在植物学中的应用概况. *河南*

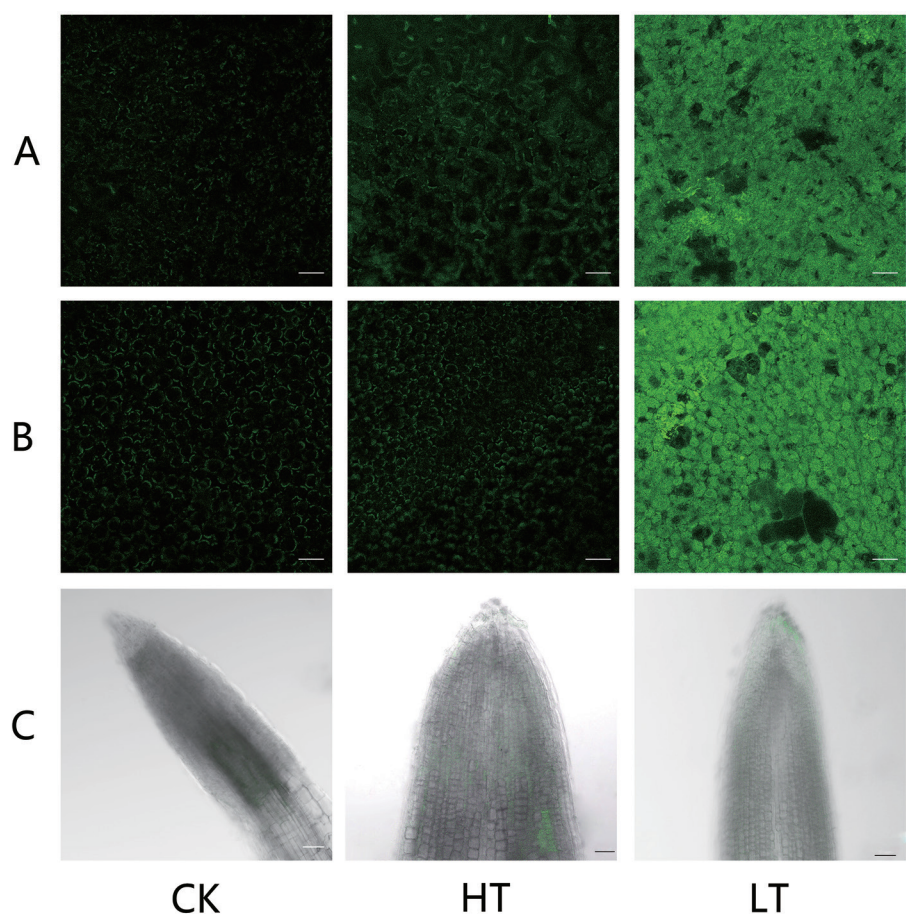


图2 不同组织在不同温度处理下的Ca²⁺分布情况

Fig. 2 Distribution of calcium ion in different tissues at different temperatures

A: 叶片正面; B: 叶片背面; C: 根系; CK: 适宜温度; HT: 高温; LT: 低温。

农业科学, 41: 9–11]

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem, 260: 3440–3450

Hu ZY, Zhao XY, Wang HR, et al (2016). Research progress on calcium detection and imaging techniques in plants. J Chin Electron Micro Soci, 35: 171–179 (in Chinese with English abstract) [胡振妍, 赵晓玉, 王浩然等(2016). 植物细胞钙离子检测与成像技术研究进展. 电子显微学报, 35: 171–179]

Jia R, Lei MQ, Xu JN, et al (2014). Research progress of Ca²⁺ channel and the effect of Ca²⁺ on plant resistance mechanism in plant cell. Plant Physiol J, 50: 1791–1800 (in Chinese with English abstract) [贾如, 雷梦琦, 徐佳妮等(2014). 植物细胞中钙通道的分布及其在植物抗逆机制中作用的研究进展. 植物生理学报, 50: 1791–1800]

Miao Y, Wu BH, Zeng GW, et al (2000). Relation between changes in ultrastructure and composition of cell wall and calcium-related physiological disorder of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Acta Phytophysiol Sin, 26: 111–116 (in Chinese with English abstract) [缪颖, 伍炳华, 曾广文等(2000). 缺钙诱发大白菜干烧心与细胞壁结构组分变化的关系. 植物生理学报, 26: 111–116]

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J Biol Chem, 264: 8171–8178

Peng RY, Bian ZY, Zhou LN, et al (2016). Hydrogen sulfide enhances nitric oxide-induced tolerance of hypoxia in maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Rep, 35: 2325–2340

Su TB, Li PR, Wang HP, et al (2019). Natural variation in a calreticulin gene causes reduced resistance to Ca²⁺ deficiency-induced tipburn in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Plant Cell Environ, 42 (11): 3044–

- 3060
- Sun XF (2005). Construction of an AFLP molecular genetic map and QTL mapping and analysis of tipburn in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) (dissertation). Taian, Shandong: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [孙秀峰(2005). 大白菜AFLP分子遗传图谱的构建及干烧心病性状的QTL定位(学位论文). 山东泰安: 山东农业大学]
- Yu XC, Na R, Zhang SY (2012). Research progress about calcium signal involved in plant resistance to disease. *Chin Agric Sci Bull*, 28: 12–16 (in Chinese with English abstract) [余晓丛, 娜仁, 张少英(2012). 钙信号在植物抗病性中的作用研究进展. *中国农学通报*, 28: 12–16]
- Yu XC, Zhang SY, Na R (2013). Optimization of fluorescence detection conditions of calcium ion in the cell in sugar beet. *J Northeast Agric Univ*, 44: 61–64 (in Chinese with English abstract) [余晓丛, 张少英, 娜仁(2013). 荧光指示剂检测甜菜胞内钙离子的条件优化. *东北农业大学学报*, 44: 61–64]
- Zhang GZ, Li RL, Wang Q (2010). Application of fluorescent dyes in calibration the plant cell Ca^{2+} concentration. *Chin Agric Sci Bull*, 26: 198–201 (in Chinese with English abstract) [张国增, 李瑞玲, 王强(2010). 荧光染料在植物细胞 Ca^{2+} 浓度测定中的应用. *中国农学通报*, 26: 198–201]
- Zhang H, Ding K, Pei GL, et al (2010). A detection method for intracellular calcium ion of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mycosystema*, 29: 64–67 (in Chinese with English abstract) [张洪, 丁可, 裴国亮等(2010). 小麦条锈菌胞质游离钙离子动态检测方法的建立. *菌物学报*, 29: 64–67]
- Zhang HC, Yin WL, Xia XL (2007). The mechanism of Ca^{2+} signal transduction under abiotic stresses in plants. *Chin Bull Bot*, 24: 114–122 (in Chinese with English abstract) [张和臣, 尹伟伦, 夏新莉(2007). 非生物逆境胁迫下植物钙信号转导的分子机制. *植物学通报*, 24: 114–122]
- Zhou LH, Huang GW (2005). Application of laser scanning confocal microscope in botany. *Acta Laser Biol Sin*, 14: 76–79 (in Chinese with English abstract) [周丽华, 黄光文(2005). 激光扫描共聚焦显微镜在植物学中的应用. *激光生物学报*, 14: 76–79]