

钙和钙调素对机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的调控

李忠光*, 龚明

云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092

摘要: 机械刺激(mechanical stimulation, MS)可提高烟草悬浮培养细胞的钙调素(calmodulin, CaM)活性, 诱导烟草悬浮培养细胞耐热性的形成, 外源 Ca^{2+} 可加强, 而 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA、质膜 Ca^{2+} 通道阻塞剂 La^{3+} 和胞内 Ca^{2+} 通道阻断剂钌红(RR), 以及 CaM 拮抗剂氯丙嗪(CPZ)和三氟拉嗪(TFP)则削弱这种耐热性的形成。这些暗示 Ca^{2+} 和 CaM 参与 MS 诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性形成的调控。

关键词: 烟草悬浮培养细胞; 机械刺激; 耐热性; 钙; 钙调素

Involvement of Calcium and Calmodulin in the Mechanical Stimulation-induced Heat Tolerance in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Suspension Culture Cells

LI Zhong-Guang*, GONG Ming

School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China

Abstract: Mechanical stimulation (MS) obviously enhanced calmodulin (CaM) activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension cells, induced the heat tolerance in tobacco suspension cells. The MS-induced heat tolerance in tobacco suspension cells was strengthened with exogenous Ca^{2+} treatment, but weakened by Ca^{2+} chelator EGTA, plasmamembrane-channel blocker La^{3+} , intracellular channel blocker ruthenium red (RR) and calmodulin antagonists chlorpromazine (CPZ) and trifluoperazine (TFP), respectively. These results suggested that Ca^{2+} and CaM were involved in the regulation of MS-induced heat tolerance in tobacco suspension cells.

Key words: tobacco suspension cells; mechanical stimulation; heat tolerance; calcium; calmodulin

植物在整个生长发育过程中并不是一帆风顺的, 总会同时或相继遭受一个或一个以上的生物或非生物逆境胁迫, 以风吹、雨淋、触摸、创伤等为代表的机械刺激(mechanical stimulation, MS)贯穿着植物的整个生长发育过程。MS 可矮化植物, 促进茎的横向加粗, 延缓植物的生长发育过程 (Braam 和 Davis 1990; Engelberth 2003; Braam 2005)。有研究表明, MS 可提高黄瓜的抗病性 (Zhao 等 2005a, b; Wang 等 2006)、番茄的耐冷性 (Keller 和 Steffen 1995) 以及拟南芥的抗生物和非生物胁迫耐性 (Walley 等 2007)。我们前期的研究结果也表明, MS 可提高烟草悬浮培养细胞的耐热性 (李忠光和龚明 2008), 但这些耐性的形成是否与 Ca^{2+} 和 CaM 有关, 迄今尚未完全弄清楚。本文以烟草悬浮培养细胞为材料, 证实 MS 预处理可提高烟草细胞的耐热性, 并且 Ca^{2+} 和 CaM 在 MS 诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性形成中起调控作用。

材料与amp;方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘Bright Yellow’

的愈伤组织来源于其幼嫩的茎髓, 悬浮细胞的具体培养方法见前文(李忠光等 2005)。

培养 5 d 的烟草悬浮培养细胞从转速 120 rpm、26 °C 的摇床中转到转速为 150 rpm、26 °C 的另一摇床中进行 MS 处理 40 min, 于转速为 120 rpm、26 °C 下恢复培养 4 h 后, 转入相同转速的摇床中于 43 °C 下进行热胁迫 7 h。分别用磷酸二酯酶法(黄号栋等 2003)和苔盼蓝染色法(de Pinto 等 1999)测定细胞的 CaM 活性和存活率。

探讨 Ca^{2+} 和 CaM 对 MS 诱导的耐热性效应时, 培养 5 d 的烟草悬浮细胞在 MS 处理前 15 min 分别用终浓度为 10、5、1、1、0.1 和 0.1 mmol·L⁻¹ 的 CaCl_2 、EGTA、 LaCl_3 、钌红(ruthenium red, RR)、氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ)和三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)处理, 按上述方法测定热胁迫后烟草悬浮细胞的存活率。

收稿 2009-01-04 修定 2009-02-05

资助 国家自然科学基金(30460016)、云南省自然科学基金(2006C0030M)和云南省教育厅基金(06Y117B)。

* E-mail: zhongguang_li@163.com; Tel: 0871-5517394

所有实验均重复3次, 每次实验的测定重复2次, 图中数据均为平均值 \pm 标准误。

实验结果

1 MS对烟草悬浮培养细胞CaM活性的影响

培养5 d的烟草悬浮细胞经过MS处理并恢复4 h后, 转入高温下胁迫7 h。与未经MS处理的对照相比, 经MS处理的烟草悬浮细胞提高了其CaM活性, 恢复4 h后达到最高峰(图1)。此外, 从图1还可以看出, 热胁迫7 h后, 经MS和未经MS处理的烟草悬浮培养细胞的CaM活性都有所下降, 但经MS处理的CaM活性高于不作MS处理的。这些表明MS可提高烟草悬浮细胞的CaM活性, 而CaM可能参与烟草悬浮细胞这种耐热性的形成。

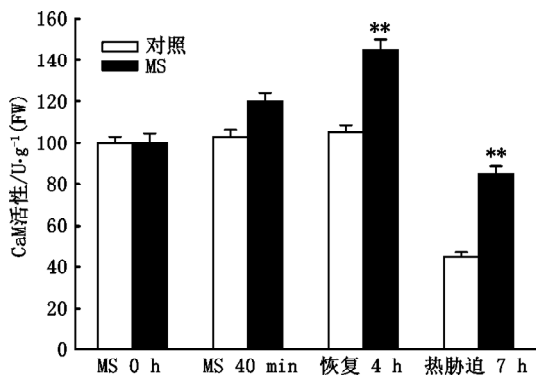


图1 MS对烟草悬浮培养细胞CaM活性的影响
Fig.1 Effect of MS on the activity of CaM in tobacco suspension culture cells
**表示 $P < 0.01$ 。

2 改变细胞Ca²⁺水平对MS诱导的烟草悬浮细胞耐热性的影响

从图2可以看出, 烟草悬浮细胞经MS处理后, 其在高温胁迫下的存活率提高。另外, 在MS处理前, 分别用Ca²⁺、EGTA、La³⁺和RR预处理后, MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性可为外源Ca²⁺所加强。相反, Ca²⁺螯合剂EGTA、质膜Ca²⁺通道阻塞剂La³⁺和胞内Ca²⁺通道阻断剂RR不同程度地削弱MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成(图2)。这些结果暗示, MS可诱导烟草悬浮培养细胞耐热性的形成, 而Ca²⁺参与这种耐热性的形成需要它跨膜进入细胞和动员胞内Ca²⁺库来实现。

3 抑制细胞CaM活性对MS诱导的烟草悬浮细胞耐热性的影响

MS可提高烟草悬浮培养细胞的CaM活性(图1), 诱导烟草悬浮培养细胞耐热性的形成(图2)。为了进一步阐明CaM参与MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成, 在MS处理前, 分别用CaM拮抗剂CPZ和TFP预处理后, 二者都不同程度地抑制MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成(图3), 说明CaM参与MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成。

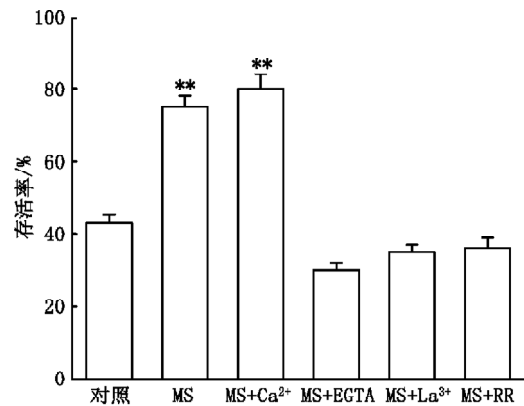


图2 外源Ca²⁺、EGTA、La³⁺和RR对MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的影响
Fig.2 Effects of exogenous Ca²⁺, EGTA, La³⁺ and RR on MS-induced heat tolerance in tobacco suspension culture cells
**表示 $P < 0.01$ 。

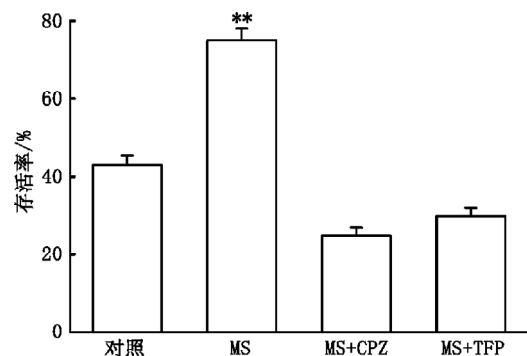


图3 CaM拮抗剂CPZ和TFP对MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的影响
Fig.3 Effects of CaM antagonists CPZ and TFP on MS-induced heat tolerance in tobacco suspension culture cells
**表示 $P < 0.01$ 。

讨 论

烟草悬浮培养细胞经过MS处理后,其CaM活性提高(图1),烟草悬浮培养细胞耐热性的形成受到诱发(李忠光和龚明 2008) (图2)。并且这种耐热性的形成可为外源Ca²⁺处理所强化,为Ca²⁺螯合剂EGTA、质膜Ca²⁺通道阻塞剂La³⁺、胞内Ca²⁺通道阻断剂RR、以及CaM拮抗剂CPZ和TFP不同程度的削弱(图2和3)。表明Ca²⁺和CaM参与MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成。

近几年来,以Ca²⁺和CaM为核心的钙信使系统在植物对多种逆境胁迫的感受、传导和适应过程中起作用(Medvedev 2005; Plieth 2005; McAinsh和Pittman 2009)。Gong等(1998)用表达水母发光蛋白的转基因烟草为材料,发现热激可诱发胞质中Ca²⁺水平迅速而短暂升高,以此作为热激信号诱导烟草耐热性的形成;李冰和周人纲(2004)也发现,小麦叶鞘组织细胞经37℃热激处理,可引起细胞质Ca²⁺水平的提高,热激4 min达到最大值,是未热激的3倍,同时他们还发现热激可引起CaM基因的表达和CaM水平的上升,促进耐热性的获得。MS可诱发酵母(Batiza 1996)和肌肉细胞(Calagham 1999)中Ca²⁺水平的提高;在表达水母发光蛋白的转基因烟草幼苗中发现,触摸和风吹等MS也可诱发胞内Ca²⁺水平的快速增加(Trewavas和Knight 1994; Knight等2000; Kikuyama等2001),并且这种Ca²⁺水平的快速增加可为RR所抑制,说明MS诱发的胞内Ca²⁺的增加主要来源于胞内Ca²⁺库。而本文的实验结果则表明,烟草悬浮培养细胞分别用Ca²⁺螯合剂EGTA、质膜Ca²⁺通道阻塞剂La³⁺和胞内Ca²⁺通道阻断剂RR预处理后,MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成受到不同程度的削弱,说明这种耐热性的形成不仅需要胞外Ca²⁺跨膜进入细胞,还需要对胞内Ca²⁺库进行动员(图2)。拟南芥经触摸、风吹、喷水等MS处理后,触摸(TCH)基因的表达受到促进,并且这些基因大都编码CaM和CaM类似蛋白(Braam和Davis 1990; Braam 2005); McCormack和Braam(2003)已从拟南芥中分离到6个编码CaM和50个编码CaM类似蛋白的基因。Jones和Mitchell(1989)报道,用MS处理大豆24 h后,下胚轴的生长即受到抑制,而用CaM拮抗剂CPZ和TFP预处理的,则MS导致的生长抑制即可得到缓解。本文实验结果也表明,MS可提高烟草

悬浮培养细胞的CaM活性,并且在高温胁迫过程中其CaM活性始终高于未经MS处理的(图1),分别用CaM拮抗剂CPZ和TFP预处理烟草悬浮培养细胞后,MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性的形成即受到抑制(图3)。这些结果都暗示以, Ca²⁺和CaM为核心的钙信使系统在MS诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性形成中可能起调控作用。

参考文献

- 黄号栋, 杨静, 龚明(2003). 用磷酸二酯酶定量检测植物钙调素方法的改进. 植物生理学通讯, 39: 156~160
- 李冰, 周人纲(2004). 钙-钙调素信号系统参与热激信号转导的研究. 西北植物学报, 24 (7): 1322~1328
- 李忠光, 龚明(2008). 机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞耐热性及其与过氧化氢的关系. 植物生理学通讯, 44 (1): 41~44
- 李忠光, 杨仕忠, 周滔, 龚明(2005). 烟草悬浮培养细胞系的建立及其对机械刺激的敏感性研究. 云南师范大学学报(自然科学版), 25 (6): 40~46
- Batiza AF, Schulz T, Masson PH (1996). Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. J Biol Chem, 271: 23357~23362
- Braam J (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. New Phytol, 165: 373~389
- Braam J, Davis RW (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. Cell, 60: 397~364
- Calaghan SC, White E (1999). The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch. Progress Biophys Mol Biol, 71: 59~90
- McCormack E, Braam J (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. New Phytol, 159: 585~598
- de Pinto MC, Francis D, Gara LD (1999). The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. Protoplasma, 209: 90~97
- Engelberth J (2003). Mechanosensing and signal transduction in tendrils. Adv Space Res, 32: 1611~1619
- Gong M, van der Luit AH, Knight MR, Trewavas AJ (1998). Heat shock-induced changes of intracellular Ca²⁺ level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. Plant Physiol, 116: 429~437
- Jones RS, Mitchell CA (1989). Calcium ion involvement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine Max*) seedlings. Physiol Plant, 76: 598~602
- Keller E, Steffen KL (1995). Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. Physiol Plant, 93: 519~525
- Kikuyama M, Tazawa M (2001). Mechanosensitive Ca²⁺ release from intracellular stores in *Nitella flexilis*. Plant Cell Physiol, 42: 358~365
- Knight H (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. Int Rev Cytol, 195: 269~324
- McAinsh MR, Pittman JK (2009). Shaping the calcium signature.

- New Phytol, 181: 275~294
- Medvedev SS (2005). Calcium signaling system in plants. Russ J Plant Physiol, 52: 249~270
- Plieth C (2005). Calcium: just another regulator in the machinery of life? Anna Bot, 96: 1~8
- Trewavas A, Knight M (1994). Mechanical signalling, calcium and plant form. Plant Mol Biol, 26: 1329~1341
- Walley JW, Coughlan S, Hudson ME, Covington MF, Kaspi R, Banu G, Harmer SL, Dehesh K (2007). Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element. PLoS Genet, 3: 1800~1812
- Wang B, Wang J, Zhao H, Zhao H (2006). Stress induced plant resistance and enzyme activity varying in cucumber. Colloids Surface B, 48: 138~142
- Zhao H, Wang BC, Zhao HC, Wang JB (2005a). Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. Colloids Surface B, 44: 36~40
- Zhao H, Zhao H, Wang JB, Wang BC, Wang Y (2005b). Stress stimulation induced resistance of plant. Colloids Surface B, 43: 174~178