

CaM拮抗剂W7对PEG胁迫下番茄幼苗根系生长和ABA、多胺动态变化的影响

张春梅¹, 邹志荣², 黄志²

(1. 河西学院农学系, 甘肃 张掖 734000; 2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以耐旱性不同的两个番茄品种为试材,采用营养液水培,研究了CaM拮抗剂W7[N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide]预处理对聚乙二醇(PEG-6000)模拟干旱胁迫下番茄幼苗根系生长及内源ABA、游离态多胺含量的影响。结果表明,用200 mmol/L W7预处理24 h,然后进行干旱胁迫处理,番茄根系内源ABA和多胺含量低于未经W7预处理的PEG胁迫处理下的值,W7处理削弱了番茄对胁迫逆境的抵抗能力,幼苗生长变弱,表明Ca²⁺-CaM信使系统通过影响多胺的含量参与调节干旱胁迫下多胺的代谢过程,对抵抗干旱逆境胁迫有积极作用。两个品种相比较,‘毛粉802’在PEG胁迫下可以积累更多的亚精胺(Spd)和精胺(Spm),受W7的影响小于‘皇冠’,表现出较强的耐旱性。

关键词: CaM拮抗剂W7; PEG胁迫; 番茄; 脱落酸; 多胺

中图分类号: S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)04-0064-05

Ca²⁺作为生物膜的稳定剂,参与调节植物细胞对逆境胁迫信号转导过程^[1],也可能作为植物细胞偶联细胞外信息和细胞内生理生化反应的第二信使传递干旱信号并调节一系列的生理生化反应^[2]。Ca²⁺的受体蛋白钙调素(Calmodulin, CaM)参与许多Ca²⁺调节的生理生化反应^[3],CaM拮抗剂W7[N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide]可导致Ca²⁺-CaM信使系统功能发生障碍,与CPZ(氯丙嗪)、TFP(三氟拉嗪)等其它CaM拮抗剂相比,W7不影响细胞膜的结构和流动性^[4,5],利用W7可阻碍Ca²⁺-CaM信使系统功能的发挥,是目前探索活体植物Ca²⁺-CaM信使功能的重要手段。

激素和多胺在植物生长发育过程中均起调节作用^[6,7]。多胺(Polyamines, PAs)是在生物代谢过程中产生的一类具有生物活性的脂肪族含氮碱,其中高等植物中的PAs主要是腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm),它们参与植物的生长发育、形态建成及逆境胁迫反应,而且充当着植物激素的媒介,作为“第二信使”参与植物逆境胁迫信号防御反应,从而缓解逆境胁迫对植物体造成的伤害^[8]。多胺与植物对外界环境胁迫的反应关系密切,当植物遇到逆境胁迫如水分胁迫、酸胁迫、盐胁迫、低温胁迫时,可诱导植物体内积累大量的多胺^[9,10]。而内源脱落酸(Abscissic acid, ABA)是植物体内重要的逆境信号物质,与各种逆境胁迫相关,素有“逆境激素”之称。

干旱胁迫是影响植物生长发育的主要因子。番茄是主栽蔬菜作物之一,目前,尚未见有关CaM拮抗剂W7与不同耐旱性的番茄品种根系内源ABA与多胺动态变化的研究报道。本文以耐旱性不同的两个番茄品种为试材,采用营养液栽培,通过向营养液中加入聚乙二醇(PEG,分子量6 000)模拟干旱胁迫,采用CaM拮抗剂W7预处理,深入研究耐旱性不同的2个番茄品种植株在干旱胁迫下CaM和内源ABA、多胺含量间的动态变化关系,探讨Ca²⁺-CaM信使系统在植物干旱胁迫中的作用,为进一步完善番茄植株的抗干旱逆境生理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于2008年8~12月在西北农林科技大学培养室内进行。采用营养液水培法,以PEG-6000为渗透剂模拟干旱胁迫,对分别购自陕西杨凌农城种业公司和广州农科院蔬菜所的6个具有地域性差异的番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller)进行室内品种间耐旱性筛选,确认品种‘毛粉802’的耐旱性比较强,品种‘皇冠’的耐旱性弱。

1.2 试验处理

种子经55℃温水消毒15 min(期间保持水的温度不变,且不停搅拌)后,浸种、催芽,选取发芽一致的饱满种子点播在带孔的营养钵中育苗,培养室中

收稿日期:2009-10-12

基金项目:国家“十一五”攻关项目(2007BAD79B04)

作者简介:张春梅(1978—),女,甘肃酒泉人,副教授,博士,主要从事设施园艺与逆境生理研究。E-mail: zazcm197828@163.com。

控制昼温为 25 ~ 30℃,夜温为 15 ~ 18℃。光照强度为 130 μmol/(m²·s),每天光照 12 h,子叶展平后浇 1/2 的 Hoagland 营养液。第 4 片真叶展开时挑选整齐一致的幼苗定植到水培槽中,调节营养液的 pH 为 6.5 ± 0.1,营养液浓度(EC)为 2.2 ~ 2.5 ms/cm,用通气泵间歇通气供氧(40 min/h),每隔 5 d 更换一次营养液,幼苗长到六叶一心时进行预培养。预培养 7 d 后,设如下 4 个处理:(1) 正常营养液栽培即对照(CK);(2) 正常营养液栽培 + 200 μmol/L W7 (Sigma 公司产品),W7 预处理(W7),幼苗的根系浸泡于 200 μmol/L W7 溶液中进行预处理,然后移栽到正常营养液中;(3) 10% PEG - 6000 处理^[11] (PEG);(4) 10% PEG - 6000 + 200 μmol/L W7 处理 (PEG + W7),幼苗于 PEG 胁迫前 24 h 浸泡于 200 μmol/L W7 溶液中进行预处理,处理结束后移栽到添加 10% PEG - 6000 (分析纯)的营养液中。处理后,分别于 0、1、3、5、7 d 在根际不同方位取样测定内源 ABA 和多胺含量;处理结束后测定根系干鲜重,不同时间换株取样。用清水冲洗,吸干、称重,用液氮速冻后,贮存于 - 72℃ 下备用。

1.3 测定项目及方法

游离态多胺含量的测定参照刘怀攀等^[12] 高效液相色谱法并略加改动,作标准曲线所用的 Put、Spd 与 Spm 购自于美国 Sigma 公司。用日本产 Shimadzu LC - IOAT 型高效液相色谱仪测定,层析柱为反向

C18 柱(150 mm × 4.6 mm),采用梯度淋洗法,流动相为甲醇和水,流速 0.5 ~ 0.7 ml/min,37℃ 为反应最佳温度,反应时间为 20 ~ 25 min,或者 30℃ 反应 30 ~ 40 min,效果与前接近。Shimadzu SPD - 10A 检测器,波长 254 nm,进样 10 μL。

内源 ABA 含量测定用高效液相色谱法^[13]。根系的干鲜重测定:处理 7 d 后根系用去离子水冲洗,吸干根系表面水分,测定其鲜重;在 115℃ 下杀青 15 min,75℃ 下烘干至恒重。

每个处理 40 株苗,每处理每次取样 6 株,3 次重复,数据统计分析采用 Excel 和 DPS 数据处理系统,以平均值 ± 标准差反应每个处理各指标的大小。

2 结果与分析

2.1 W7 对幼苗根系生长的影响

番茄幼苗根系的生长变化如表 1 所示。PEG 胁迫处理后,番茄幼苗根系的干、鲜重均显著低于正常对照,耐旱性较强的‘毛粉 802’和耐旱性较弱的‘皇冠’的鲜重分别降低 28.00% 和 30.43%,干重分别降低 22.09% 和 24.43%;W7 预处理后 PEG 胁迫的幼苗干、鲜重均显著小于单纯 PEG 胁迫处理下的值,表明 W7 处理后降低了番茄植株对 PEG 胁迫的抵抗力;W7 预处理后正常营养液栽培和对照相比干、鲜重差异不显著,说明 W7 对正常营养液栽培的植株生长的影响较小。

表 1 CaM 拮抗剂 W7 对 PEG 胁迫下幼苗根系鲜重和干重的影响

Table 1 Effect of calmodulin antagonist W7 on fresh weight and dry weight in tomato seedling roots under PEG stress

处理 Treatments	鲜重(g/株) Fresh weight(g/plant)		干重(g/株) Dry weight(g/plant)	
	毛粉 802 Maofen 802	皇冠 Huangguan	毛粉 802 Maofen 802	皇冠 Huangguan
CK	57.46 ± 3.20 a	55.96 ± 2.36 a	4.21 ± 0.03 a	3.97 ± 0.05 a
W7	54.64 ± 1.48 a	53.08 ± 1.24 a	3.92 ± 0.01 a	3.81 ± 0.07 a
10% PEG	41.37 ± 2.60 b	38.93 ± 1.71 b	3.28 ± 0.02 b	3.00 ± 0.07 b
10% PEG + W7	25.12 ± 2.25 c	24.58 ± 1.97 c	2.19 ± 0.21 c	2.27 ± 0.03 c

注:字母不同表示在 5% 水平上差异显著。
Note: The different small letters in the table indicate significant difference(P < 0.05)。

2.2 W7 对幼苗根系内源激素 ABA 含量的影响

番茄幼苗根系内源激素 ABA 含量的变化如图 1 所示。‘毛粉 802’在 PEG 胁迫期间呈上升趋势,PEG 处理含量最高,在 7 d 达到高峰,其次是 PEG + W7 处理,第三为 W7 处理,对照 CK 的 ABA 含量在处理期间保持平稳;‘皇冠’的变化趋势与‘毛粉 802’相似,但含量较低。PEG + W7 处理和 PEG 处理相比差异显著,表明 W7 处理后显著降低了番茄植株内源 ABA 的含量;W7 预处理后正常营养液栽培和对照内源 ABA 含量相比差异不显著;表明 W7 对正常营养液栽培的植株生长的影响较小。

2.3 W7 对幼苗根系内源游离态多胺含量的影响

番茄幼苗根系内源游离态多胺含量的变化如图 2 所示。‘毛粉 802’的游离态 Put 含量在 PEG 胁迫期间呈先上升后下降的趋势,对照 CK 的 Put 含量在处理期间保持平稳,PEG 胁迫处理的含量高于对照,在胁迫 3 d 时达到峰值,随后缓慢降低;W7 处理的含量高于对照 CK,并于胁迫 5 d 时达到峰值;PEG + W7 处理的含量最高,与其它 3 个处理相比差异显著。‘皇冠’的变化趋势与‘毛粉 802’相似,二者之间游离态 Put 含量差别较小。

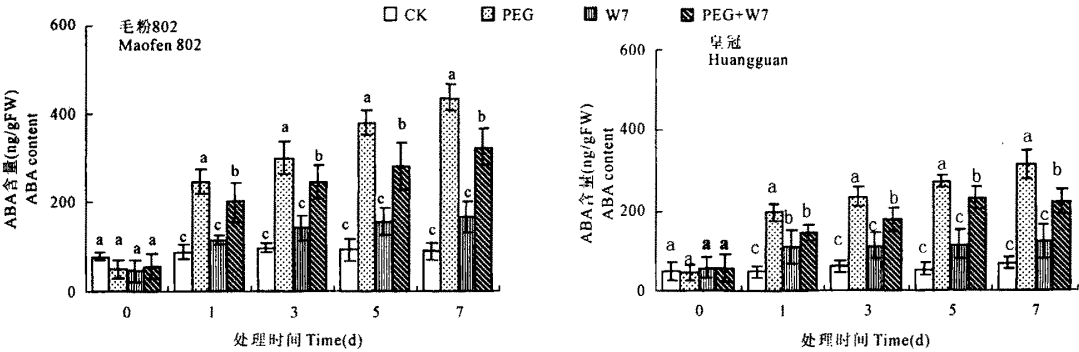


图 1 CaM 拮抗剂 W7 对 PEG 胁迫下 2 个品种番茄幼苗根系内源 ABA 含量的影响

Fig.1 Effect of calmodulin antagonist W7 on endogenous ABA contents in seedling roots of two tomato cultivars under PEG stress

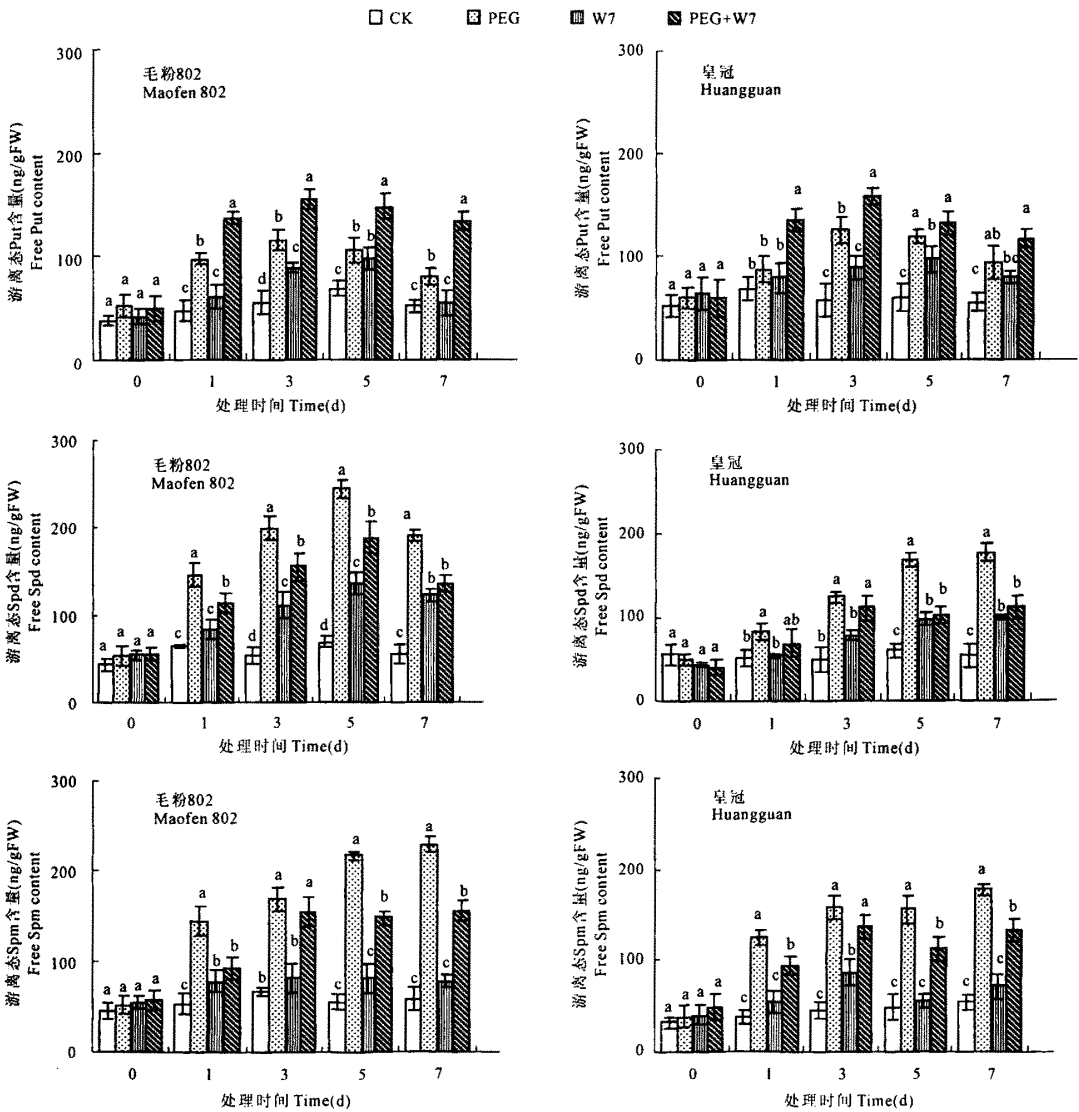


图 2 CaM 拮抗剂 W7 对 PEG 胁迫下 2 个品种番茄幼苗根系内源游离态多胺含量的影响

Fig.2 Effect of calmodulin antagonist W7 on endogenous free polyamine contents in seedling roots of two tomato cultivars under PEG stress

游离态Spd含量,‘毛粉802’在处理期间呈上升趋势,PEG处理含量最高,在5d达到高峰,其次是PEG+W7处理,第三为W7处理,对照最低,各处理间的Spd含量的差异较大;‘皇冠’的变化趋势与‘毛粉802’相似,但含量较低,PEG处理的含量高于对照CK,也高于PEG+W7处理的值,但整个处理期间差异不显著,PEG+W和W7处理之间差异较小。

游离态Spm含量,‘毛粉802’在处理期间呈上升趋势,高峰出现在胁迫后7d,处理之间的含量大小PEG>PEG+W7>W7>对照,W7处理和对照处理之间差异不显著。‘皇冠’的含量变化趋势和‘毛粉802’相似,但含量较低。PEG胁迫处理下耐旱性强的番茄品种‘毛粉802’累积Spd和Spm的能力大于耐旱性弱的‘皇冠’。

3 讨论与结论

以 Ca^{2+} -CaM为核心的钙信使系统在植物对逆境胁迫的信号感受与适应中起重要作用。CaM是由148个氨基酸残基组成的小分子酸性蛋白,是一种普遍存在于真核细胞内的多效钙受体蛋白,参与多种细胞代谢过程,是细胞信号转导系统的重要组成部分。CaM作为 Ca^{2+} 受体,在 Ca^{2+} 信号系统传导中起着关键作用,当植物受到逆境胁迫时, Ca^{2+} 浓度上升,并与CaM结合激活一系列的靶酶和非酶蛋白,从而触发许多重要的细胞反应,调控着植物生命代谢及基因表达^[14-16]。以 Ca^{2+} -CaM为核心的钙信使系统在植物对逆境胁迫的信号感受与适应中起着重要作用。本试验结果表明,正常营养液栽培的番茄生长正常,PEG胁迫下幼苗生长势较弱,根系鲜重、干重均低于正常对照(CK),而单纯用W7预处理的番茄幼苗虽比正常营养液中的生长势降低,但干、鲜重的差异均未达到显著水平,而PEG+W7处理后幼苗根系生长在4个处理中表现最差,说明CaM拮抗剂W7的预处理加重了PEG逆境胁迫对植株的伤害,说明CaM在番茄接受和传递干旱胁迫信号上具有重要作用。

本试验结果表明,PEG胁迫下2个品种番茄根系内源ABA的含量增加,说明ABA参与番茄PEG胁迫的适应性生理反应,使用CaM拮抗剂W7处理后,ABA含量比单纯PEG胁迫有所减少,说明W7通过阻碍钙信使的调节作用阻碍了ABA的积累,而ABA能提高植物耐旱能力^[17-19],降低ABA的含量进而会降低植株的抗旱性。PEG胁迫下根系内源激素ABA含量的变化受钙信号系统调节^[20],表明 Ca^{2+} -CaM可能参与干旱信号ABA的信息传递过

程。

多胺的代谢特征之一是植物体受到非生物逆境胁迫时,体内多胺浓度迅速发生变化,并且不同种类、不同状态的多胺可以相互转化,如游离态Put可以向Spd或Spm转变,从而增强胁迫条件下膜的稳定性^[21]。细胞通过多胺含量的增加,对稳定细胞膜、核酸及蛋白质等大分子物质有重要的作用。PEG胁迫下番茄幼苗根系3种游离态多胺含量显著增加是番茄对PEG胁迫的一种适应性反应^[19]。本研究表明,PEG+W7处理的游离态Put含量高于PEG胁迫处理,而Spm和Spd却小于PEG胁迫处理,表明W7的使用抑制了Put向Spd和Spm的转化,仅用W7预处理的多胺含量与对照处理差异不显著,说明CaM拮抗剂W7对正常栽培的番茄幼苗影响不大。CaM拮抗剂W7处理后,多胺含量比单纯PEG胁迫有所减少,其可能的作用机理是:CaM与W7结合而不再与底物靶酶结合,导致 Ca^{2+} -CaM信使系统的功能发生障碍, Ca^{2+} 信号传导途径受到限制,不能及时对逆境胁迫的刺激作出反应,加重了对番茄幼苗的伤害。以上结果说明,CaM拮抗剂W7的使用使番茄多胺含量降低,CaM参与了干旱胁迫下多胺的代谢过程。由此判断, Ca^{2+} -CaM信使系统对抵抗干旱逆境胁迫有着积极作用。

综上所述, Ca^{2+} -CaM信使系统参与了番茄植株的抗旱反应,CaM拮抗剂W7的使用阻碍了 Ca^{2+} -CaM信使功能,由此降低了PEG胁迫下番茄幼苗的抗逆性。这可能是由于PEG模拟的干旱胁迫导致 Ca^{2+} 瞬时增加,诱发产生钙信号,进而调控了包括CaM基因在内的特定基因的表达,通过 Ca^{2+} -CaM信使启动了增强番茄幼苗抗逆性的反应,进而降低干旱逆境胁迫对植株的伤害。‘毛粉802’在PEG胁迫下可以积累更多的ABA、亚精胺(Spd)和精胺(Spm),受W7的影响小于耐旱性弱的品种‘皇冠’,表现出较强的耐旱性。

参考文献:

- [1] 孙大业,郭艳林,马力耕.细胞信号传导(第3版)[M].北京:科学出版社,2001.
- [2] Hinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water stress response[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 327-334.
- [3] Bush D S. Regulation of cytosolic calcium in plants[J]. Plant Physiol, 1993, 103(1): 7.
- [4] Hiroyoshi Hidaka, Yasuharu Sasaki, Toshio Tanaka, et al. N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci USA,

- 1981,78(7):4354—4357.
- [5] 梁 颖,王三根. Ca^{2+} 对低温下水稻幼苗膜的保护作用[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 59—64.
- [6] 林文雄, 吴杏春, 梁康远, 等. UV-B 辐射增强对水稻多胺代谢及内源激素含量的影响[J]. 应用生态学报, 2002, 13(7): 807—813.
- [7] 李良俊, 潘恩超, 许 超, 等. 莲藕膨大过程中内源激素、水杨酸和多胺含量的变化[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1106—1108.
- [8] Kasukabe Y, He LX, Nada K, et al. Over expression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *A. thaliana* [J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45(6): 712—722.
- [9] 於丙军, 吉晓佳, 刘 俊, 等. 氯化钠胁迫下野生和栽培大豆幼苗体内的多胺水平变化[J]. 应用生态学报, 2004, 15(7): 1223—1226.
- [10] Mejia EG DE, Martinez R V, Castano T E. Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein and in vitro protein digestibility in teary (*Phaseolus acutifolius* L.) and common (*Phaseolus vulgaris* L.) bean seeds[J]. Sci Food Agric, 2003, 83: 1022—1030.
- [11] 程智慧, 孟焕文, Julie D, 等. 水分胁迫对番茄幼苗转化酶表达及糖代谢的影响[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 278—279.
- [12] 刘怀攀, 朱自学, 刘天学, 等. 渗透胁迫对小麦胚芽鞘内多胺的种类、形态和含量的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3): 293—299.
- [13] 兰彦平. 水分胁迫下苹果体内信号物质的研究 茉莉酸、脱落酸的作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- [14] Sanders D, Brown I C, Harper J F. Communicating with calcium [J]. Plant Cell, 1999, 11: 691—706.
- [15] Rudd J J, Frankling T V E. Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signaling pathways in plant cells[J]. New Phytol, 2001, 151: 7—33.
- [16] Snedden W A, Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants[J]. New Phytol, 2001, 151: 35—66.
- [17] 郭秀林, 刘子会, 李广敏. Ca^{2+} /CaM 对玉米干旱信息的介导作用研究[J]. 作物学报, 2005, 31(8): 1001—1006.
- [18] Schroeder J I, Kwak J M, Allen G J. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants[J]. Nature, 2001, 410: 327—330.
- [19] 张春梅, 邹志荣, 张志新, 等. 聚乙二醇胁迫下的番茄幼苗 ABA、JA 和多胺含量以及多胺氧化酶活性的变化[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(4): 689—692.
- [20] 李青云, 葛会波, 胡淑明, 等. 盐胁迫下外源钙对草莓内源激素含量的影响[J]. 西北植物学报, 2008, 28(3): 517—522.
- [21] Zhao F G, Sun C, Liu Y L, Liu Z P. Effect of salinity stress on the levels of covalently and noncovalently bound polyamines in plasma membrane and tonoplast isolated from leaves and roots of barley seedlings[J]. 植物学报, 2002, 42: 920—924.

Effect of calmodulin antagonist W7 on dynamic changes in endogenous ABA, polyamine contents and growth of tomato seedling roots under PEG stress

ZHANG Chun-mei¹, ZOU Zhi-rong², HUANG Zhi²

(1. Department of Agricultural Sciences, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;

2. Department of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effect of calmodulin antagonist W7 on the changes in endogenous ABA, polyamine contents and growth of tomato seedling roots under hypoxia stress was studied. The results showed that after pre-treatment with 200 mmol/L W7 for 24 h before the hypoxia stress, the contents of free spermine and free spermidine were lower than those in tomato seedling roots by only hypoxia stress treatment, which suggested that the pretreatment with W7 could lead to the decrease in polyamine contents in tomato roots compared to the only treatment of hypoxia stress, reduce the ability of cucumber against hypoxia stress, and make the plant growth become weaker. Finally, it was indicated that the effect of W7 was found smaller on 'Maofen802' than on 'Huangguan' cultivar of tomato, and 'Maofen802' had greater capability against PEG stress.

Keywords: calmodulin antagonist W7; PEG stress; tomato; polyamine