

干旱胁迫下 CaM 与小麦胚芽鞘和幼根生长的关系

关军锋 郑桂珍 李广敏*

(河北省农林科学院遗传生理研究所,河北石家庄 050051)

摘要 在聚乙二醇(PEG)-6000(20%)诱导的干旱胁迫下,小麦(*Triticum aestivum* L. cv. 4185)胚芽鞘及根系的生长受到抑制。胁迫初期,胚芽鞘及根系 CaM 水平迅速下降,之后随胁迫程度加重而逐渐积累。一定浓度(50 μmol/L)的 CaM 拮抗剂三氟拉嗪(TFP)和氯丙嗪(CPZ)均抑制小麦胚芽鞘及根系的生长,提高过氧化物酶(POD)活性。这些结果表明,小麦体内的 CaM 参与调节了干旱胁迫下小麦胚芽鞘及根系的生长,并且与 POD 有密切的关系,维持正常的 CaM 代谢对干旱胁迫下小麦的生长有利。

关键词 干旱胁迫;小麦;胚芽鞘;根系;CaM

中图分类号: S512

Relationship between CaM and Growth of Coleoptile and Root in Wheat under Drought Stress

GUAN Jun-Feng, ZHENG Gui-Zhen, LI Guang-Min

(Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

Abstract The growth of coleoptile and root in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. 4185) was suppressed under drought stress induced by PEG-6000 (20%). The CaM level of coleoptile and root decreased rapidly at first stage of stress, and then accumulated with further stress. TFP and CPZ, two CaM antagonists, could inhibit growth of coleoptile and root at higher concentration (50 μmol/L), and enhance the activity of peroxidase (POD). These results suggested that the growth of coleoptile and root was influenced by internal CaM and closely related to POD in wheat. Thus, it was favorable for maintain the normal CaM metabolism to growth of wheat under drought stress.

Key words Drought stress; Wheat; Coleoptile; Root; CaM

干旱会抑制植物生长,主要表现为对细胞伸长的抑制^[1,2]。在干旱胁迫下,小麦胚芽鞘生长速率下降^[3,4],并且,小麦胚芽鞘的长度成为预测小麦抗旱性的重要指标^[5],而过氧化物酶(POD)在控制细胞的伸展中起重要作用^[6]。另外,钙与植物抗旱性的关系十分密切,主要表现在缺钙条件下植物对干旱更为敏感,而外施钙适当提高植物钙水平后,植物抗旱性增强^[7]。此外,细胞内 Ca²⁺ 不仅可作为转导干旱信号的信号物质,与 CaM 一起发挥重要作用;而且调节一些重要物质如 ABA、脯氨酸和干旱特异蛋白的表达^[7~10]。CaM 是一种重要的钙结合蛋白,人为阻断 Ca²⁺-CaM 信使系统会加剧幼苗的逆境损伤,表明 Ca²⁺-CaM 信使系统可能参与抗逆性调

控^[11]。本文以小麦胚芽鞘和根为材料,研究了在聚乙二醇(PEG)诱导的干旱胁迫下 CaM 含量的变化,以及体外使用 CaM 拮抗剂 TFP(三氟拉嗪)和 CPZ(氯丙嗪)的效应,目的在于进一步了解干旱胁迫下 CaM 与小麦幼苗生长的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为冬小麦(*Triticum aestivum* L.) 4185 品种。

1.2 种子的萌发

精选种子后,用蒸馏水冲洗干净,放入铺有 2 层湿滤纸的培养皿,并加盖,于 25℃ 培养箱暗培养 24 h

*基金项目:河北省博士资金资助项目(00547001D-1)。

作者简介:关军锋(1966-),男,博士,研究员,主要从事逆境生理研究。E-mail: junfeng-guan @263.net

Received(收稿日期):2003-05-19, Accepted(接受日期):2003-12-21.

(此时单个小麦种子的幼根长 0.5 cm 左右,胚芽鞘长 0.2 cm 左右)。

1.3 处理方法

1.3.1 20% PEG6000 处理 取萌发 24 h 的小麦种子,用 20% PEG6000 溶液浸没其根系,以蒸馏水为对照,分别在处理后的 0、6、12、24、36、48 h 取样,称鲜重后,液氮速冻保存,用于提取 CaM。重复 3 次,每重复 30 粒种子。

1.3.2 CaM 拮抗剂(CPZ、TFP)处理 取萌发 24 h 的小麦种子,分别用含或不含 20% PEG6000 的 CPZ (0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)、TFP (0、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 浸没其根系,处理 48 h 后取样,称鲜重后立即研磨,提取 POD 并测定其活性。重复 3 次,每重复 30 粒种子。

1.4 生长量的测定

在处理后的不同时间用电子天平测定 30 粒种子的幼根、胚芽鞘鲜重,计算成每粒小麦种子的幼根、胚芽鞘鲜重。

1.5 POD 的提取及测定

取 0.2 g 鲜重样品置冰浴研钵,加 POD 酶提取液(PBS pH 7.0) 1 mL,充分研磨,然后将匀浆液于 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为酶粗提液。参

照张志良(1990)愈创木酚法^[12],在 470 nm 比色测定 POD 活性。

1.6 CaM 的提取和测定

参考文献[13]的方法,取 0.5 g 样品,加 1.5 mL 提取液(50 mmol/L Tris、2 mmol/L EGTA、0.15 mol/L NaCl、20 mmol/L NaHSO₃、0.5 mmol/L PMSF, pH 8.0),冰浴磨成匀浆,12 000 r/min 冷冻离心 30 min,取上清液,在 90 °C 恒温水浴中加热 3 min,然后于冷水中迅速冷却,12 000 r/min 冷冻离心 30 min,上清液即为 CaM 粗提液,采用酶联免疫固相吸附法测定 CaM 含量。蛋白含量采用考马斯亮蓝 G250 法,用牛血清蛋白(BSA)作标准曲线,于波长 595 nm 比色测定。CaM、兔抗 CaM 血清由河北师范大学生命科学学院分子细胞实验室提供。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对小麦胚芽鞘、根生长量的影响

干旱胁迫下小麦胚芽鞘及根系的鲜重低于对照,并分别在胁迫处理 24 h、36 h 之后差别显著,说明干旱胁迫抑制了小麦生长,并以胚芽鞘受抑明显(图 1)。

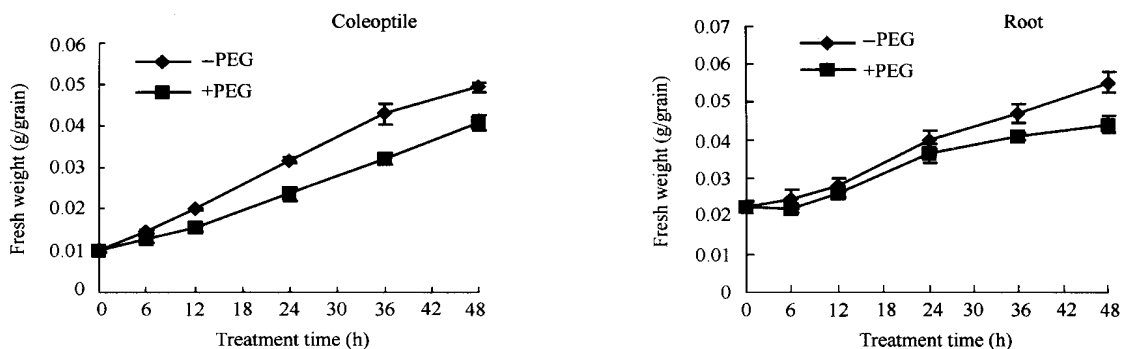


图 1 干旱胁迫对小麦胚芽鞘、根生长的影响

Fig. 1 Effects of drought stress on growth of coleoptile and root in wheat

2.2 干旱胁迫对小麦胚芽鞘、根 CaM 含量的影响

在胚芽鞘中,未干旱胁迫情况下,CaM 含量最初 6 h 略有上升,至 12 h 逐渐降低,然后保持相对稳定;干旱胁迫处理 6 h 和 12 h 时 CaM 含量均低于对照,分别为对照的 46.1% 和 54.9%,然后逐渐增加并高于对照,到 48 h 时为对照的 4.052 倍(图 2)。

在根系中,未干旱胁迫情况下,CaM 含量在处理

12 h 时有一峰值,之后逐渐下降;而干旱胁迫处理的初期 CaM 含量急剧降低,远远低于对照,但胁迫 24 h 后逐步增加,并高于对照,处理 48 h 时上升为对照的 5.12 倍(图 2)。

以上结果表明,干旱胁迫初期,小麦胚芽鞘和根系中的 CaM 含量迅速降低,至干旱胁迫到一定程度时,CaM 大量积累。

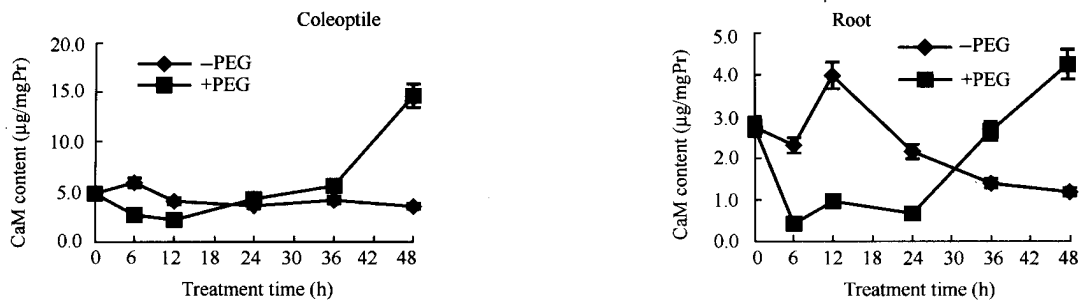


图2 干旱胁迫对小麦胚芽鞘、根 CaM 含量的影响

Fig. 2 Effects of drought stress on CaM content of coleoptile and root in wheat

2.3 干旱胁迫下 TFP 对小麦胚芽鞘、根生长及其 POD 活性的影响

为进一步探讨内源 CaM 在干旱胁迫下对小麦胚芽鞘和根生长的作用,进行了 CaM 拮抗剂 TFP 处理。

结果表明,无论干旱胁迫与否,高浓度(50 µmol/L) TFP 对小麦根和胚芽鞘的生长均有明显的抑制作用,且随 TFP 浓度的增大而增强,并以干旱胁迫处理下抑制作用更为明显;低浓度(10、25 µmol/L)

的 TFP 对小麦根和胚芽鞘的生长无抑制作用(图 3-A, B)。

为进一步寻找 TFP 影响小麦胚芽鞘、根生长的机制,测定了组织中 POD 活性。结果表明,无论干旱胁迫与否,高浓度(50 µmol/L) TFP 对小麦根、胚芽鞘的 POD 活性均有促进作用(图 3-C, D)。而低浓度(10 µmol/L) TFP 使小麦根系的 POD 活性降低,25 µmol/L 的 TFP 作用居中(图 3-C, D)。

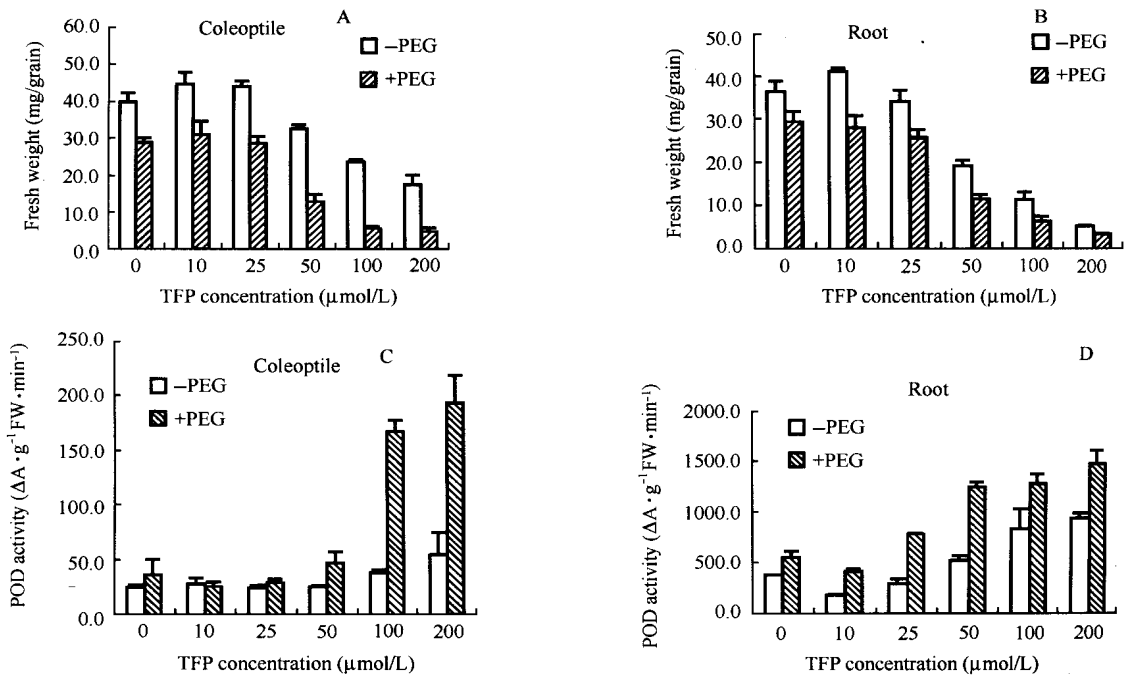


图3 干旱胁迫下 TFP 对小麦胚芽鞘、根生长及 POD 活性的影响

Fig. 3 Effects of TFP on growth and POD activity of coleoptile and root in wheat under drought stress

这些结果说明,当 TFP 达到一定浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)后会明显抑制小麦根和胚芽鞘的生长,且提高 POD 活性,并以干旱胁迫处理更为显著。

进一步分析显示,小麦根、胚芽鞘鲜重与其各自的 POD 活性呈幂函数关系, r 分别为 -0.8646 和 -0.9718,达极显著水平。说明干旱胁迫下 TFP 对小麦根、胚芽鞘生长的抑制与 POD 活性的增加密切相关,CaM 的作用同样与 POD 活性有关。

2.4 干旱胁迫下 CPZ 对小麦胚芽鞘、根生长及其 POD 活性的影响

CPZ 是另一种 CaM 拮抗剂。无论干旱胁迫与否,大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 以后,CPZ 对胚芽鞘和根的生长都具抑制作用,且随浓度增大而增强。低浓度(25

$\mu\text{mol/L}$)的作用较小(图 4-A,B)。同时,100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CPZ 对根、胚芽鞘 POD 活性都具有显著的促进作用(图 4-C,D)。

这说明,当 CPZ 达到一定浓度(大于 50 $\mu\text{mol/L}$)后会明显抑制小麦根和胚芽鞘的生长,且提高 POD 活性。

进一步分析表明,该处理条件下,小麦根、胚芽鞘鲜重与各自的 POD 活性呈幂函数关系, r 分别为 -0.9550 和 -0.9444,达极显著水平。这说明在干旱胁迫下一定浓度的 CPZ 对小麦根、胚芽鞘生长的抑制与 POD 活性增加密切相关,也表明 CaM 对小麦根和胚芽鞘生长的影响也与 POD 活性有关。

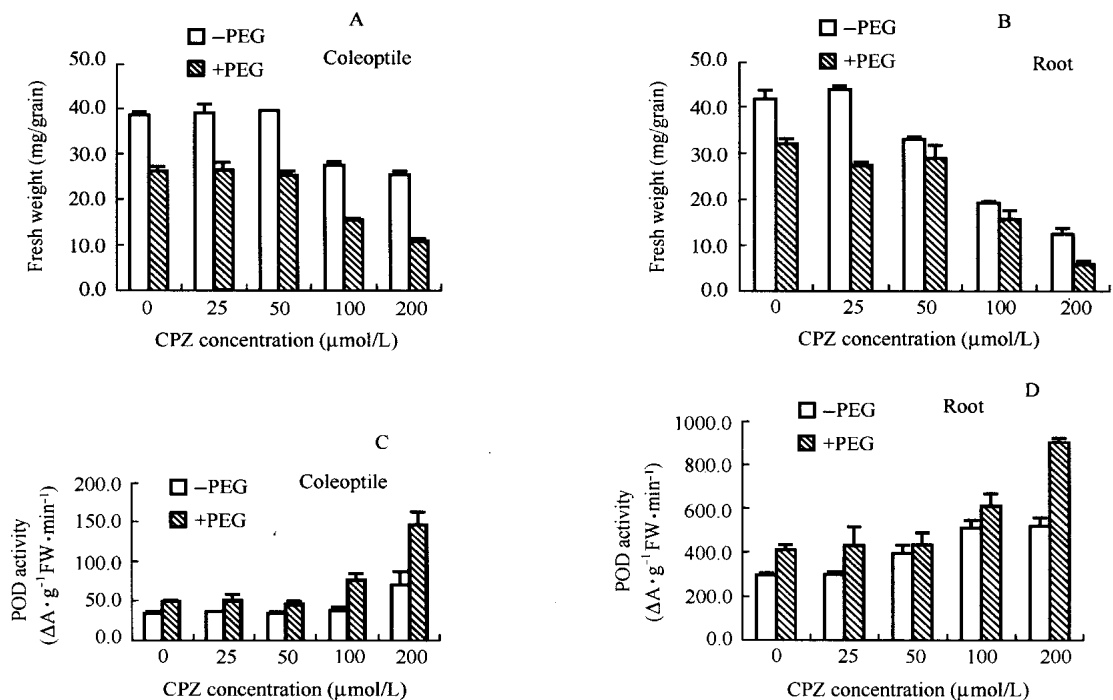


图 4 干旱胁迫下 CPZ 对小麦胚芽鞘、根生长及 POD 活性的影响

Fig. 4 Effects of CPZ on growth and POD activity of coleoptile and root in wheat under drought stress

3 讨论

干旱胁迫会对植物产生多方面的影响,其中对生长的影响是比较直观的生理效应。这种影响是细胞生长受抑的结果^[2]。就小麦而言,干旱胁迫对胚芽鞘的抑制远大于对根的抑制(图 1)。其原因之一是激素水平的变化,如胚芽鞘内的 ABA 含量的升高和 IAA 含量的降低,但根系的生长与两种内源激素

的关系则较为复杂^[14]。同时,POD 活性的升高也是不可忽略的原因^[6]。这是因为过氧化物酶能氧化吲哚乙酸,使吲哚乙酸减少,因此过氧化物酶活性与细胞伸长可能存在负相关性^[15]。本文结果表明,小麦根、胚芽鞘鲜重与 POD 活性呈极显著负相关(图 3,图 4),反映出小麦生长受到抑制与 POD 活性提高密切相关。

由于 CPZ、TFP 等能专一性地与 CaM 结合,使

CaM不再与目标酶结合,因此常用作CaM拮抗剂来探讨体内CaM在细胞中的调节功能。本实验证明,与未进行干旱胁迫相比,在干旱胁迫下使用一定浓度(大于50 μmol/L)的TFP、CPZ,能更明显抑制小麦胚芽鞘和根的生长和提高POD活性,说明在干旱胁迫下正常CaM的作用可能使POD维持在较低水平,从而使小麦根、胚芽鞘的生长不至于被过分抑制。因此,保持正常的CaM功能对小麦胚芽鞘和根的生长很重要,内源CaM在干旱胁迫下的作用可能更为重要,若体内CaM活性下降,将刺激POD活性,抑制生长,干旱胁迫造成的伤害程度将增大。

Ca²⁺作为细胞内功能调节第二信使,在与CaM结合后调节了细胞内多种重要酶的活性和许多生理活动及生长过程。在干旱胁迫下,小麦胚芽鞘及根系的CaM水平均呈先降后升的趋势,且胁迫初期CaM生成受抑早于生长受抑(图1,图2),推测这种早期CaM含量的降低可能是小麦幼苗对干旱胁迫反应的信号之一;CaM含量高峰的推迟可能是干旱胁迫程度加剧的结果,CaM过分积累必将导致细胞内Ca²⁺-CaM系统的紊乱,其结果使抗氧化酶活性下降,生理代谢失调^[11],进一步加剧胁迫伤害,其详细机制还有待深入研究。

References

- [1] Li L-C(李连朝), Wang X-C(王学臣). The relationship between plant cell elongation and wall properties under water deficits. *Plant Physiology Communication*(植物生理学通讯), 1998, **34**(3):161 - 167
- [2] Sakurai N, Tanaka S, Kuraiishi S. Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition II. Composition of pectic and hemicelulosic polysaccharides. *Plant Cell Physiol*, 1987, **28**:1 059 - 1 070
- [3] Wang W(王玮), Zou Q(邹琦), Yang J(杨军), Zhou X(周燮). The dynamic characteristics of coleoptile growth under water stress in different drought-resistant wheats. *Plant Physiology Communication*(植物生理学通讯), 1999, **35**(5):359 - 362
- [4] Waskabayashi K, Hoson T, Kamisaka S. Osmotic stress-induced growth suppression of dark-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles. *Plant Cell Physiol*, 1997, **38**:297 - 303
- [5] Wang W(王玮), Zou Q(邹琦). Studied on coleoptile length as criterion of appraising drought resistance in wheat. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 1997, **23**(4):459 - 467
- [6] Gu Z-M(顾者珉), Shen Z-Y(沈曾佑), Zhang Z-L(张志良), Yan J-Q(颜季琼). The effect of cytokinins on wheat coleoptile growth under water stress. *Acta Phytophysiological Sinica*(植物生理学报), 1984, **10**(4):353 - 361
- [7] Guan J-F(关军锋), Li G-M(李广敏). The relationship between Ca²⁺ and drought-resistance in plants. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2001, **18**(4):473 - 478
- [8] Abdel B R. Calcium channels and membrane disorders induced by drought stress in *Vicia faba* plants supplemented with calcium. *Acta Physiol Plant*, 1998, **20**(2):149 - 153
- [9] Pestencz A, Erdei L. Calcium-dependent protein kinase in maize and sorghum induced by polyethylene glycol. *Physiol Plant*, 1996, **97**:360 - 364
- [10] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 1997, **115**:327 - 334
- [11] Zong H(宗会), Li M-Q(李明启). Role of calcium messenger in plant acclimation to abiotic stress. *Plant Physiology Communication*(植物生理学通讯), 2001, **37**(4):330 - 335
- [12] Zhang Z-L(张志良). Experiment Guide for Plant Physiology(植物生理学实验指导). Beijing: Advanced Education Press, 1990. 2 - 3 (in Chinese)
- [13] Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences(中国科学院上海植物生理研究所) & Shanghai Society for Plant Physiology(上海市植物生理学会). Methods of Modern Plant Physiology(现代植物生理学实验指南). Beijing: Science Press, 1999(in Chinese)
- [14] Wang W(王玮), Li D-Q(李德全), Yang X-H(杨兴洪), Zou Q(邹琦), Zhou X(周燮), Yang J(杨军). Effects of water stress on level changes of IAA and ABA in root and shoot of different drought resistance wheat. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2000, **26**(6):737 - 742
- [15] Zhou R-G(周人刚), Han Y-S(韩雅珊), Yan L-F(阎隆飞). The relationship of plant height and peroxidase. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 1983, **9**(4):267 - 273