

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

李忠光, 龚明*

云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092

摘要: 机械刺激可诱发烟草悬浮培养细胞中 H_2O_2 的积累, 提高烟草悬浮培养细胞在高温胁迫下的存活率和再生能力, 缓解高温胁迫下的细胞活力丧失和膜伤害, 外源 H_2O_2 预处理也可提高烟草悬浮细胞的耐热性。这些暗示 H_2O_2 作为信号分子可触发机械刺激诱导的烟草悬浮细胞耐热性形成。

关键词: 烟草悬浮培养细胞; 机械刺激; 耐热性; H_2O_2

Mechanical Stimulation-induced Heat Tolerance of Suspension Culture Cells in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and Its Relation to H_2O_2

LI Zhong-Guang, GONG Ming*

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

Abstract: Mechanical stimulation (MS) induced H_2O_2 accumulation in tobacco suspension culture cells, increased survival percentage and regrowth of tobacco suspension cells under high temperature at 43 °C, and alleviated the loss of cell vitality and membrane damage. In addition, exogenous H_2O_2 pretreatment also significantly enhanced heat tolerance in tobacco suspension cells. These results suggested that H_2O_2 could act as a signaling molecule to induce the formation of MS-induced heat tolerance in tobacco suspension cells.

Key words: tobacco suspension cells; mechanical stimulation; heat tolerance; H_2O_2

机械刺激(mechanical stimulation, MS)如风吹、雨淋、触摸、创伤等是自然界中普遍存在而又容易被忽视的一种胁迫因子。长期以来, 人们多侧重于MS对植物生长发育的影响, 即所谓的接触形态建成作用及其可能的生理生化机制的研究(Garces等2001; Engelberth 2003; Braam和Davis 1990; Braam 2005), 而对于MS与植物抗逆性的关系只有一些初步报道(Keller和Steffen 1995; Zhao等2005a, b; Wang等2006), MS是否可提高植物耐热性, 以及这些耐性的形成是否与 H_2O_2 有关, 迄今尚未见报道。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, 并且阐明 H_2O_2 在MS诱导的耐热性形成中可能起信号分子作用。

材料与方法

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2005a)。

培养5 d的烟草悬浮培养细胞从120 rpm、26 °C的摇床中转到150 rpm、26 °C的另一摇床中进行

MS处理40 min, 于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下分别进行热胁迫0、3、7、9 h后用苔盼蓝染色法(de Pinto等1999)、TTC法和丙二醛(MDA)法(Gong等2001)测定细胞的存活率和活力以及膜伤害程度。同时, 将经过高温胁迫后的细胞按前文方法(李忠光等2005a)接种到新鲜的培养基中, 培养7 d后测定其鲜重, 计算其再生能力。

作外源 H_2O_2 预处理和细胞的存活率实验时, 取培养5 d的烟草悬浮培养细胞用无菌过滤器分别加入终浓度为0、0.05、0.1、0.5、1 mmol·L⁻¹ H_2O_2 , 处理4 h后, 转入43 °C的摇床中热胁迫7 h, 按上述方法测定细胞存活率。

测定 H_2O_2 时, 将培养5 d的烟草悬浮细胞转到150 rpm摇床中进行MS处理, 每隔10 min按前文方法(李忠光等2007)测定烟草悬浮细胞介质中

收稿 2007-10-25 修定 2007-12-25

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)。

* 通讯作者(E-mail: gongming63@163.com; Tel: 0871-5517394)。

的 H_2O_2 含量。

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 机械刺激对烟草悬浮培养细胞耐热性的效应

培养5 d的烟草悬浮细胞经过MS处理并恢复4 h后, 与未经MS处理的相比, 经MS处理的烟草悬浮细胞其在高温胁迫下的存活率和再生能力提高(图1-a、b), 其在高温胁迫过程中活力下降和膜伤害程度有所缓解(图1-c、d)。这些表明MS可提高烟草悬浮细胞的耐热性。

2 H_2O_2 与MS诱发烟草悬浮细胞耐热性形成的关系

从图2和3可以看出, 烟草悬浮细胞在MS处理过程中可诱发 H_2O_2 的积累, MS处理50 min达到最高峰, 为未经MS处理的近34倍, 而后缓慢下降(图2)。这与我们实验室的热激初期可诱发玉米幼苗内源 H_2O_2 含量的迅速上升的结果(Gong等

2001)是相似的。

培养5 d的烟草悬浮细胞用不同浓度的 H_2O_2 预处理后, 与未经 H_2O_2 处理的相比, 0.05和0.1 $mmol\cdot L^{-1}$ H_2O_2 预处理可以不同程度地提高高温胁迫下的烟草悬浮细胞存活率, 尤其以后者更为明显; 而经0.5和1.0 $mmol\cdot L^{-1}$ H_2O_2 预处理的烟草悬浮细胞则可不同程度地削弱其在高温胁迫下的存活率(图3), 表明适宜浓度的 H_2O_2 预处理可提高烟草悬浮细胞的耐热性。

讨论

烟草悬浮培养细胞经过MS处理(150 rpm)后, 其在高温胁迫过程中的存活率和再生能力均提高, 细胞活力的下降和膜伤程度也得到缓解(图1), 表明MS可诱导烟草悬浮细胞耐热性的形成。

触摸作为一种MS可诱导番茄幼苗耐冷性的形成(Keller和Steffen 1995), 机械压力也可诱导黄瓜产生抗病性(Wang等2006; Zhao等2005a, b), 但这些耐性形成的机制仍然了解甚少, 一般

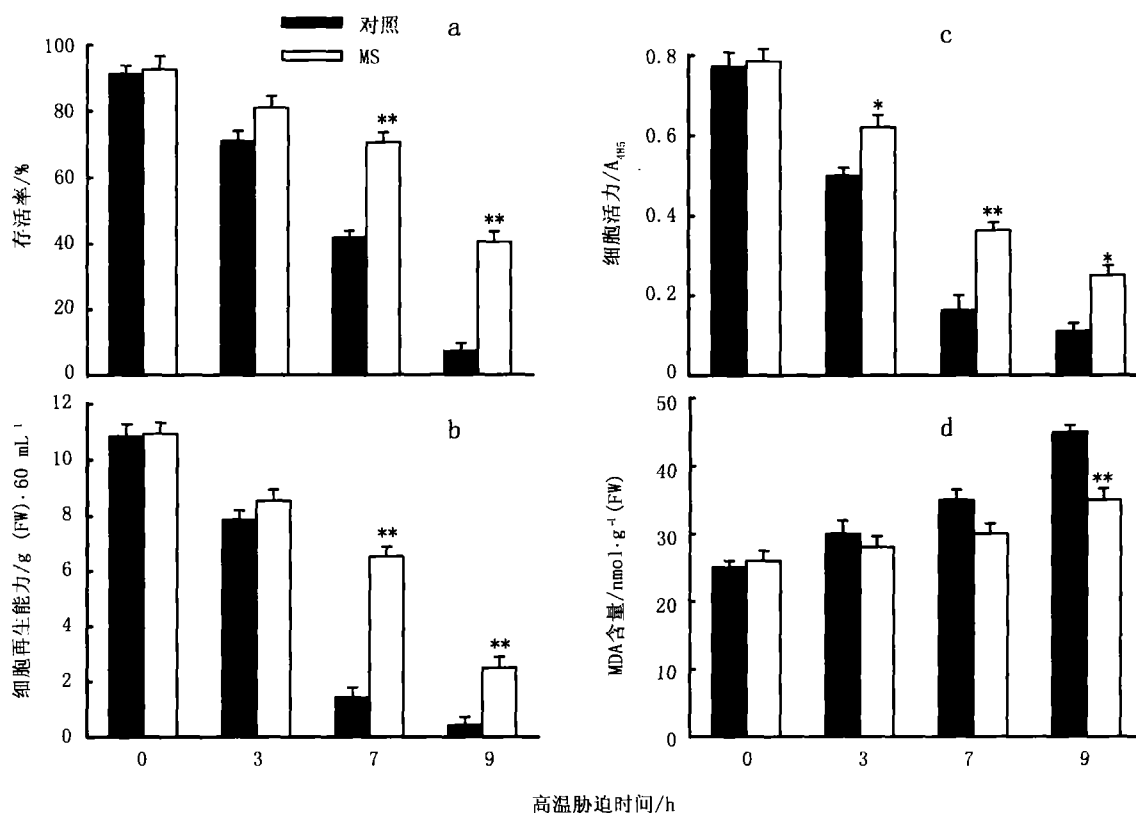


图1 机械刺激对高温胁迫下烟草悬浮培养细胞存活率、再生能力、活力和膜伤害的影响
Fig.1 Effects of mechanical stimulation on survival percentage, regrowth, vitality, and membrane damage under high temperature in tobacco suspension cultured cells

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

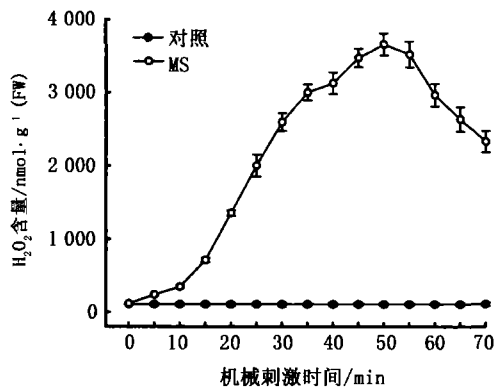


图2 机械刺激对烟草悬浮培养细胞中 H_2O_2 积累的影响
Fig.2 Effect of mechanical stimulation on H_2O_2 accumulation in tobacco suspension cultured cells

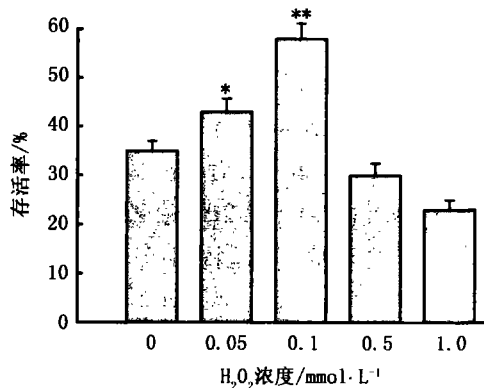


图3 高温胁迫下外源 H_2O_2 预处理对烟草悬浮培养细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of H_2O_2 -pretreatment on survival percentage of tobacco suspension cultured cells under high temperature
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

都认为可能与触摸基因(TCH)的表达(Braam 和 Davis 1990; Braam 2005; Lee 等 2005)和抗氧化酶系统活性的增强(Wang 等 2006; Zhao 等 2005a, b)有关。近年来的研究表明, H_2O_2 在植物对环境胁迫的信号感受、传导与适应过程中起作用(Foyer 等 1997; Neill 等 2002a, b)。我们实验室以前和本文结果也表明, 热激或MS初期也会诱发 H_2O_2 的积累(Gong 等 2001, 图2), 这暗示热激或MS处理初期迅速的 H_2O_2 积累可能是诱导植物耐热性形成的生理基础之一。此外有实验表明, 外源 H_2O_2 预处理可提高玉米和水稻幼苗的耐热性、耐冷性、耐旱性和耐盐性(Foyer 等 1997; Gong 等 2001; Uchida 等 2002; 李忠光等 2005b)。本文结果也表明, 外源 H_2O_2 预处理可提高烟草悬

浮细胞的耐热性(图3), 这从另一个侧面为作为信号分子的 H_2O_2 可触发烟草悬浮细胞耐热性形成的说法提供了又一个证据。

参考文献

- 李忠光, 杜朝昆, 龚明(2005b). Ca^{2+} 和钙调素对 H_2O_2 诱导的玉米幼苗耐热性的调控. 植物生理与分子生物学学报, 31 (5): 515~519
- 李忠光, 宋玉泉, 龚明(2007). 二甲酚橙法用于测定植物组织中的过氧化氢. 云南师范大学学报(自然科学版), 27 (3): 50~54
- 李忠光, 杨仕忠, 周滔, 龚明(2005a). 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
- 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: 357~364
- de Pinto MC, Francis D, de Gara L (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
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant*, 100: 241~254
- Garces H, Durzan D, Pedrosa MC (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 87: 567~574
- Gong M, Chen B, Li ZG, Guo LH (2001). Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H_2O_2 . *J Plant Physiol*, 158: 1125~1130
- 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
- Lee D, Polisensky DH, Braam J (2005). Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and *XTH* genes. *New Phytol*, 165: 429~444
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002a). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot*, 53: 1237~1247
- Neill SJ, Desikan R, Hancock J (2002b). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 388~395
- Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci*, 163: 515~523
- Wang BC, Wang JB, Zhao HC, Zhao H (2006). Stress induced plant resistance and enzyme activity varying in cucumber. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 48: 138~142
- Zhao H, Wang BC, Zhao HC, Wang JB (2005a). Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 44: 36~40
- Zhao HC, Zhao H, Wang JB, Wang BC, Wang YN (2005b). Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 43: 174~178