

## 黑荆树悬浮单细胞低温驯化\*

王敬文 蒋 晶

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

**摘要** 由黑荆树幼茎诱导愈伤组织,由愈伤组织制备悬浮单细胞。悬浮细胞可以作为最小的驯化单位。在2℃、8 h短光照条件下14 d,悬浮细胞可耐受到-7.5℃(LD<sub>50</sub>),而不经驯化的仅耐受到-2.5℃。悬浮细胞抗寒性是用细胞质壁分离法测定的。单一的低温或短光照驯化不能使单细胞提高抗寒力,必须低温和短光照同时存在才能使其驯化,提高抗寒力。

**关键词** 黑荆树; 悬浮细胞; 低温驯化

黑荆树(*Acacia mearnsii* Wild)是我国引种的优良栲胶原料树种,现主要在我国亚热带地区种植,冬季低温常使一些种植区的黑荆树受到冻害,-5℃低温是黑荆树耐受的低温极限。随着我国建设事业的发展,对栲胶的需求量越来越大,为了扩大栲胶资源和便于就地生产栲胶,需要向北扩大黑荆树种植范围,因而需要选育抗寒品系。提高木本植物的抗寒性和选育抗寒品系,传统的方法是实生苗逐代低温驯化,低温和短日照作为外部刺激的信号,选育抗寒品系的周期需要几十年。欧洲赤松只能耐受-7℃低温,当对其幼苗进行充分的低温驯化时可耐受-31℃低温<sup>[3,4]</sup>,但用苗进行低温驯化要花费相当长的时间,而且当达到致死低温时又会造成苗死亡。近代生物技术的发展为选育抗寒品系提供了新手段,为了缩短选育抗寒品系周期,缩小植物驯化单位,在严酷的条件下驯化了草本植物的愈伤组织<sup>[2]</sup>和木本植物(杨树)的愈伤组织<sup>[6]</sup>,然而由于愈伤组织细胞的不均一性和分化成苗的无预定性,使选育抗寒苗木仍有相当多困难。为了克服这些困难,本文研究低温驯化单位是否可缩小到单细胞和单细胞能否接受外界信号进行低温驯化而提高抗寒能力。

### 一、材料和方法

黑荆树(*Acacia mearnsii* Wild)种子采自四川省通江县林地,该处是我国黑荆树种植区域的最北边缘。

#### 黑荆树悬浮细胞制备

取黑荆树种子500粒,投入300 ml沸水中,待其自然冷却至室温后用纱布搓去种子表面的蜡质层,洗净,放在0.5%升汞中消毒5 min,用无菌水洗去升汞,接种在1%的琼脂培养基中,25℃培养、发芽,待幼茎长至4—5 cm时,取白色幼茎切段接种在改良的

本文于1989年5月3日收到。

\* 本课题由中国林科院科学基金资助,本所黑荆树课题组提供实验种子,特此一并致谢。

MS培养基中,培养基组成如下:  $\text{KNO}_3$  18.80 mM、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25 mM、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  20.63 mM、 $\text{CaCl}_2$  2.29 mM、 $\text{MgSO}_4$  1.50 mM、 $\text{MnSO}_4$  0.10 mM、 $\text{ZnSO}_4$   $3.7 \times 10^{-2}$  mM、 $\text{CuSO}_4$   $0.01 \times 10^{-2}$  mM、 $\text{KI}$   $0.5 \times 10^{-2}$  mM、 $\text{CoCl}_2$   $0.01 \times 10^{-2}$  mM、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.10 mM、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   $0.01 \times 10^{-2}$  mM、甘氨酸 $2.66 \times 10^{-2}$  mM、生物素 $0.02 \times 10^{-2}$  mM、叶酸 $0.11 \times 10^{-2}$  mM、肌醇0.56 mM、尼克酸 $4.06 \times 10^{-2}$  mM、盐酸吡哆醛 $0.02 \times 10^{-2}$  mM、盐酸硫胺0.12 mM、硫酸腺嘌呤 $21.72 \times 10^{-2}$  mM、赤霉素 $0.12 \times 10^{-2}$  mM、激动素 $0.93 \times 10^{-2}$  mM、2,4-D  $0.9 \times 10^{-2}$  mM、蔗糖30 g/L、酪朊水解物1 g/L、琼脂8 g/L, pH 5.8。培养2—3周后诱导出愈伤组织,将旺盛生长的愈伤组织转移到不加琼脂的相同培养基中,以150 rpm往复振荡,200目尼龙丝网滤去细胞团块,滤液为细胞悬浮液,单细胞在95%以上。

### 驯化处理

将悬浮细胞制备液按双层培养法<sup>[1]</sup>分装在三角瓶中,驯化处理共分6组:①在25℃、每天16 h光照条件下保持14 d;②在25℃、每天8 h光照条件下保持14 d;③在2℃、每天16 h光照条件下保持14 d;④在2℃、每天8 h光照条件下保持14 d;⑤在25℃、每天16 h光照条件下保持7 d,随后在2℃、每天8 h光照条件下保持7 d;⑥在2℃、每天8 h光照条件下保持7 d,随后在25℃、每天16 h光照条件下保持7 d。

### 冷冻试验

将经过上述驯化处理后的每组样品再分装于试管中进行冷冻试验,测定其抗寒性。制备0℃到-12℃的梯度冷浴,用食盐和冰块调节冰浴温度,每一梯度降温2℃,每组样品在各个温度梯度上保持2 h,冷冻处理后试管放回0℃过夜,测定抗寒性。测定抗寒性用细胞质壁分离法,取一滴悬浮细胞液放入0.5 M蔗糖液中,显微镜下观测细胞质壁分离,能发生典型质壁分离的细胞是活细胞,不能发生典型质壁分离的细胞都计数为死细胞,每份样品观测20个视野,统计2 000个细胞的存活数。

## 二、实验结果

本研究实验重复三次,现报告三次实验的平均结果。

(一)在整个实验研究过程中,各组驯化处理的悬浮细胞都发生自然死亡,自然死亡率为14.4%—16.2%,这表明细胞自然死亡不是由于驯化条件引起的,而是由于细胞本身生理状态不良引起的,从气态生长的愈伤组织转移到悬浮的液相环境,会引起一部分细胞自然死亡。

(二)在实验过程中,悬浮细胞从25℃转到2℃这一急剧变化,不影响悬浮细胞的活力,在25℃制备和贮存的悬浮细胞能发生质壁分离的为96.4%,转移到2℃环境中6 h后测定,能发生质壁分离的细胞为95.8%。

在25℃和16 h长光照条件下制备和贮存的悬浮细胞能发生质壁分离的为95.2%,转移到2℃、8 h短光照环境中放置8 h后测定,能发生质壁分离的细胞为94.1%,这表明从25℃、16 h长光照环境中转移到2℃、8 h短光照环境中也不影响悬浮细胞的活力。

(三)在25℃、每天16 h光照条件下保持14 d,也就是没有进行低温驯化的悬浮细胞半数致死温度为-2.5℃(图1中折线I)。在25℃、每天8 h光照条件下保持14 d,也就是只有8 h短光照单一信号驯化的悬浮细胞半数致死温度为-2.5℃(图1中折线II),短光照处理没有提抗寒性。在2℃、每天16 h光照条件下保持14 d的悬浮细胞半数致死温度为-2.5℃(图1

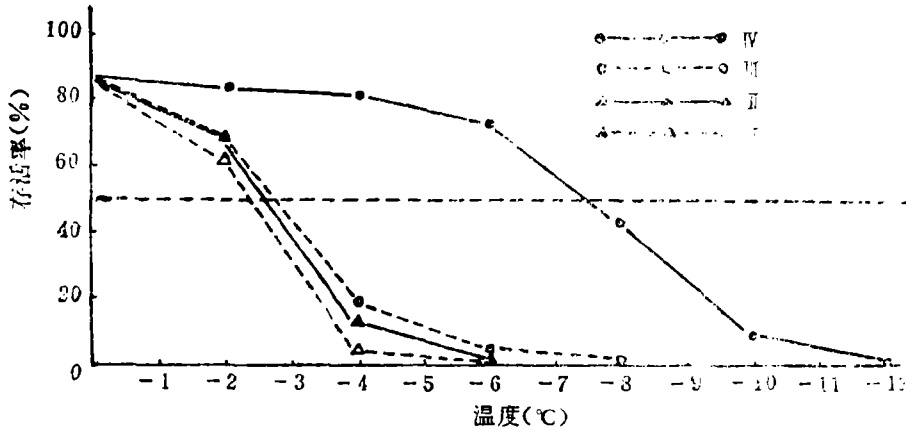


图1 在不同温度和光照条件下驯化处理14d的黑荆树悬浮细胞存活百分率  
 I为25℃、16h光照下驯化；II为25℃、8h光照下驯化；  
 III为2℃、16h光照下驯化；IV为2℃、8h光照下驯化

中折线Ⅲ)，单一的低温驯化条件也不能提高细胞的抗寒性。

(四) 在2℃、每天8h短光照条件下保持14d的悬浮细胞的抗寒性大幅度提高,半数致死温度为从-2.5℃降低到-7.5℃(图1中折线Ⅳ),当温度降低到-12℃时仍有4.3%的细胞存活下来。实验表明驯化过程中低温和短光照这二个外部信号必须同时存在才能刺激细胞提高抗寒能力。在驯化过程中,不论是前半期还是后半期只要低温和短光照二个信号同时存在都能够使悬浮细胞提高抗寒能力(图2,图3),但是这二个信号持续时间只有7d,使得驯化还不够充分,细胞的抗寒潜力还没能够充分表达出来。

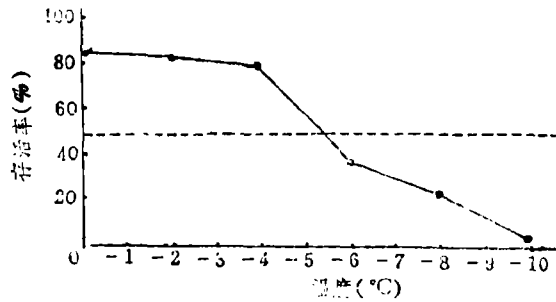


图2 在25℃、8h光照条件下驯化7d,又继续在2℃、8h光照条件下驯化7d的黑荆树悬浮细胞存活百分率

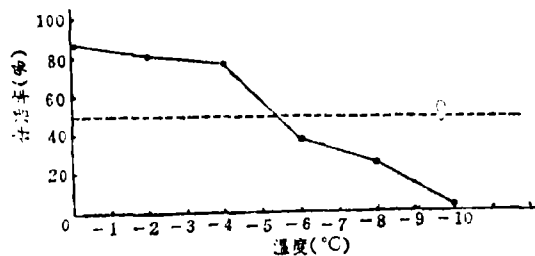


图3 在2℃、8h光照条件下驯化7d,又继续在25℃、8h光照条件下驯化7d的黑荆树悬浮细胞存活百分率

### 三、讨 论

完整的苗木、愈伤组织可以接受低温和短光照这二个驯化信号而提高抗寒能力，本研究证明单细胞作为最小的驯化单位也是可以进行驯化的，通过低温驯化提高了抗寒能力。实验研究也证明，低温和短光照这二个条件必须是同时存在并持续到一定时间(7 d 以上)才能提高悬浮细胞的抗寒能力，低温和短光照单一因子或二个因子不同时存在都不能使单细胞通过驯化过程提高其抗寒能力，而且只有当二个信号同时存在并达到一定时间长度才能最大限度地提高单细胞抗寒能力，低温、短光照和其持续时间是驯化细胞抗寒性所不可缺少的三个条件。但与悬浮细胞显然不同的是 Christersson<sup>[3]</sup> 的研究指出：完整植株能够对单个环境因子的信号起反应而提高抗寒能力。

通常认为光敏色素参与了驯化过程，但在暗培养的愈伤组织细胞中用双波段分光光度计检测不到光敏色素<sup>[6]</sup>，这并不必然意味着在暗培养的愈伤组织或悬浮细胞中不存在任何形式的光敏色素。尽管目前还没有检测到悬浮细胞中的光敏色素，但它确实能够接受短光照这一刺激信号，并且只有在和低温同时存在的条件下才能够完成驯化过程，这就表明悬浮细胞提高抗寒能力不是简单的生理适应性，而有可能是由于遗传结构上的变化。通过驯化处理，如果选择出抗寒性提高幅度大的悬浮单细胞并进行单细胞培养，进而能分化出植株，就有可能培育出抗寒的品系，这样就有可能把通过逐代实生苗驯化法培育抗寒品系的周期从几十年缩短到很短的时间内完成。然而，悬浮细胞通过驯化而提高的抗寒力特性能否在以后的细胞培养和分化过程中继续保持下来还是需要进一步研究的。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译, 1978, 植物组织和细胞培养, 上海科学技术出版社。
- [2] Bannier, I. J. et al., 1976, Cold acclimation of chrysanthemum callus cultures, *J. Am. Hortic. Sci.*, 101: 409—412.
- [3] Christersson, L., 1978, The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardness in seedling of *Pinus sylvestris* and *Picea abies*, *Physiol. Plant*, 44: 288—289.
- [4] Hellergren, J., 1931, Frost hardness development in response to fertilization, *Physiol. Plant*, 52: 297—301.
- [5] Hellergren, J., 1983, Cold acclimation of suspension cultures of *Pinus sylvestris* in response to light and temperature treatment, *Plant Physiol.*, 72: 992—995.
- [6] Sakai, A. et al., 1973, Survival of polar callus at super-low temperatures after cold acclimation, *Plant Cell Physiol.*, 14: 1201—1204.

## COLD ACCLIMATION OF SUSPENSION CULTURES OF *ACACIA MEARNSII* WILD

Wang Jingwen    Jiang jing

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

**Abstract** Suspension cultures of *Acacia mearnsii* Wild were prepared from callus. Six different experiments were made: (a) The suspension were placed at 25°C in a LD of 16 h for 14 d; (b) The suspension were placed at 25°C in a SD of 8 h for 14 d; (c) The suspension were placed at 2°C in a LD of 16 h for 14 d; (d) The suspension were placed at 2°C in a SD of 8 h for 14 d; (e) The suspension were placed at 25°C in a LD of 16 h for 7 d followed by placing it at 2°C in a SD of 8 h for 7 d; (f) The suspension were placed at 2°C in a SD of 8 h for 7 d followed by placing it at 25°C in a LD of 16 h for 7 d. The survival percentage of suspension cultures exposed to different conditions were measured by plasmolysis of cell. These results indicated that nonacclimated suspension cultures (i. e. with a LD of 16 h and 25°C treatment) showed a survival temperature of -2.5°C, and a SD of 8 h for 14 d or a LD of 16 h at 2°C for 14 d also gave a survival temperature of -2.5°C. However, when the suspension cultures were exposed to a SD of 8 h at 2°C for 7 d or 14 d, the survival temperature went from -2.5°C to -5.5°C for 7 d of acclimation, and to -7.5°C for 14 d. The suspension cultures responded only to the combined SD and 2°C treatment. An increased freezing survival by individual stimuli (light or temperature alone) was not possible. It was necessary that both SD and temperature of 2°C were at the same time to increase freezing survival.

**Key words** *Acacia mearnsii*; suspension cell; cold acclimation