

低温驯化的黑荆树悬浮培养细胞中 可溶性蛋白质含量变化*

王敬文 蒋晶

摘要 低温驯化能够诱导黑荆树悬浮培养细胞增强抗冻性, LT_{50} 从 -3.4°C 下降到 -8.2°C 。低温驯化诱导可溶性蛋白质含量增加, 其增加的时间进程与细胞抗冻性发育呈平行关系。环己亚胺抑制可溶性蛋白质含量增加, 同时也抑制细胞抗冻性发育。在低温驯化期间不同时间加入环己亚胺抑制抗冻性发育, 表明低温驯化10 d后抗冻性发育接近完成。糖对增加驯化细胞中可溶性蛋白质有促进作用, 加快增加含量的时间进程, 但对最终提高蛋白质含量水平无效, 糖不是木本植物低温驯化诱导抗冻性的因子。

关键词 黑荆树、悬浮细胞、低温驯化、可溶性蛋白质、抗冻性

木本植物在低温驯化过程中许多生化代谢活动仍活跃地进行着, 它们是植物抗寒基因表达的中间过程, 一方面接受低温和短光照的驯化诱导, 另一方面又为最终抗冻结构的形成奠定基础, 而且这些生化过程本身也在抗冻中起着作用, 因此与低温驯化有关的代谢变化是许多研究者们的重要课题。植物在低温驯化过程中, 碳水化合物、蛋白质、脂类、氨基酸、激素等都发现有许多重大的相关变化^[1], 所研究的这些代谢变化基本上都是越冬草木植物完整植株在越冬前自然寒冷驯化条件下发生的相关变化, 由于完整植株的吸收、光合、代谢和运输等过程依然进行着, 不可否认对这些代谢变化与抗寒性发育之间的关系往往是似是而非的。树木与草木植物其内生节奏和抗寒性发育有所不同, 而且直接针对树木的研究较少。黑荆树是我国中、南亚热带栽培树种, 冬季气温 -5°C 左右即遭受严重冻害。黑荆树悬浮培养细胞经低温驯化提高了抗冻性, LT_{50} 达到 -7.6°C ^[2], 在人工条件下低温驯化悬浮培养细胞, 研究驯化过程中细胞的生化代谢变化与抗寒性发育的关系, 有助于认识抗寒性发育的生理机制。

1 材料和方法

1.1 黑荆树悬浮培养细胞制备

取黑荆树 (*Acacia mearnsii* De Wild) 种子投入500 ml沸水中, 待其自然冷却至室温后用纱布搓去种皮蜡质, 经消毒后接种在1%琼脂培养基上, 25°C 发芽, 待幼茎长至4~5 cm时切取茎段接于MS培养基上, MS含BA 0.93×10^{-2} mM, 2,4-D 0.9×10^{-2} mM, 蔗

1993-03-09收稿。

王敬文副研究员, 蒋晶(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

*国家自然科学基金资助项目。

糖30 g/L, 酪朊水解物1 g/L, pH5.8, 培养约2周诱导出色愈伤组织。将旺盛生长的愈伤组织转移到MS培养液中(内含1%果胶酶), 35℃保温30 min, 略加摇动即释出大量细胞, 经200目尼龙布过滤去除细胞块团, 滤液离心沉降分离出细胞, 用MS液洗涤3次, 重新悬浮于MS培养液中, 单细胞在95%以上。

1.2 低温驯化

将制备的细胞在MS培养液中正常悬浮培养2 d, 随后转入调整过的MS培养液(减去BA, 减去酪朊水解物, 蔗糖50 g/L)中, 在2℃、每天8 h光照和每分钟110转动条件下进行悬浮培养。

1.3 冷冻试验

收集悬浮细胞样品, 用水洗涤3次, 再重新悬浮于水中, 每份样品等分于3次试管中。制备0℃到-14℃的梯度冷浴, 每梯度降低2℃, 用氯化钠和冰块调节冷浴温度。细胞在0℃保持30 min, 然后在每一相应梯度温度保持1 h。冷冻处理后取出试管, 在2℃保持2 h解冻。测定细胞存活率用质壁分离法, 取细胞悬浮液滴入0.5 M蔗糖液中, 镜检细胞质壁分离, 能发生正常典型质壁分离的细胞计数为活细胞, 不能发生典型质壁分离的都计数为死细胞, 每份样品观测20个视野, 统计2 000个细胞的存活率。

1.4 可溶性蛋白质测定

离心收集悬浮培养细胞样品, 以20倍量(V/W)的-15℃冰冻丙酮脱水制得丙酮粉, 称取200 mg, 加入10 ml 0.05 M Tris-HCl缓冲液(pH7.0), 于0~4℃浸提过夜。提取液经离心去渣后加入5%三氯乙酸20 ml, 30 min后再离心(5 000 rpm)10 min, 弃去上清液, 获得的蛋白质再悬浮于0.1 N氢氧化钠中, 再按Lowry等^[3]方法测定蛋白质含量。

2 实验结果

2.1 低温驯化对抗冻性的诱导作用

树木悬浮培养细胞低温驯化象它的亲本母株一样, 诱导条件必须包括低温和短光照^[2], 黑荆树悬浮培养细胞在2℃、每天8 h光照下驯化14 d, 抗冻性显著增强。未经低温驯化(25℃每天16 h光照)的对照LT₅₀为-3.5℃, 在-6℃细胞全部死亡, 而经低温驯化的细胞LT₅₀为-8.4℃, 在-12℃仍有8.6%的细胞存活(图1)。

2.2 可溶性蛋白质含量的变化

黑荆树悬浮培养细胞在2℃、每天8 h光照下进行低温驯化14 d, 每2天取样分析可溶性蛋白质含量(图2)。未低温驯化的对照可溶性蛋白质含量比较稳定, 而经低温驯化的其含量显著增加, 随着驯化天数增加而增高, 第12天达到高峰。

2.3 外源糖对蛋白质含量的影响

植物在低温下含糖量增高是一个普遍现象, 糖在植物抗冻中也有重要作用。黑荆树悬浮

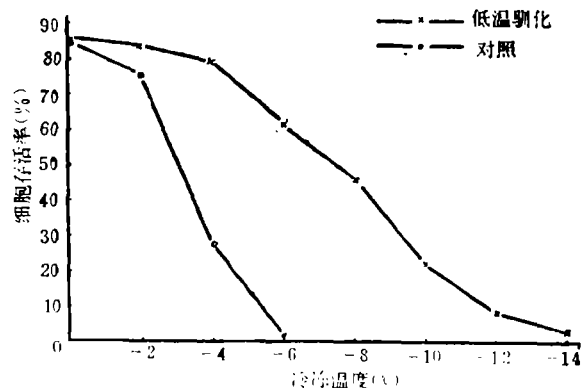


图1 低温驯化对提高黑荆树悬浮培养细胞抗冻性的作用

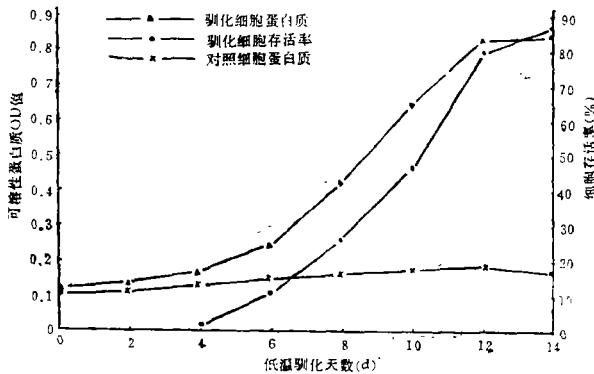


图2 黑荆树悬浮培养细胞低温驯化过程中可溶性蛋白质含量的变化和抗冻性发育
(抗冻性是在 -6°C 下测定的细胞存活率(%),未驯化(对照)存活率为0)

黑荆树悬浮培养细胞在低温驯化期间发生蛋白质的相关变化,随着低温驯化时间的增长,细胞中可溶性蛋白质含量增高(图2),与此同时细胞的抗冻性也得以充分发育,提高了抗冻性。未驯化的对照细胞耐冻极限为 -6°C ,存活率为0,而经低温驯化的细胞驯化4 d以上就能耐受 -6°C 冷冻,随着驯化天数增加耐冻性也随之增加,抗冻存活率与蛋白质含量的变化有着明显的平行关系(图2)。

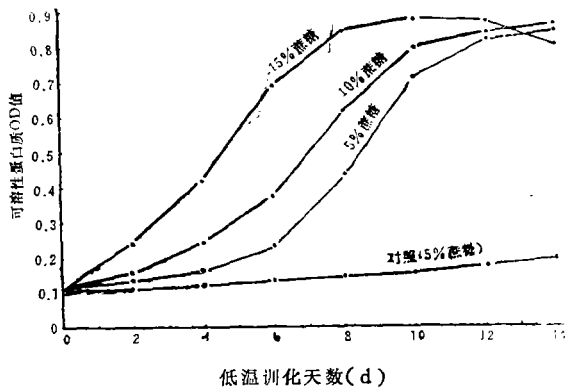


图3 外源糖对低温驯化细胞可溶性蛋白质含量的影响

和在 -6°C 的耐冻性,结果如表1。环己亚胺抑制可溶性蛋白的合成和积累,浓度越高抑制作用越强,浓度大于 5 mg/L 时完全抑制了蛋白质合成,与此相应的细胞抗冻性也随之降低,环己亚胺浓度高于 5 mg/L 时,低温驯化的细胞其抗冻能力也随之丧失。

表1 环己亚胺对蛋白质合成和细胞抗冻性的抑制作用

环己亚胺浓度(mg/L)	0	0.1	1	2	5	10
可溶性蛋白质含量OD值	0.837 ± 0.022	0.714 ± 0.032	0.596 ± 0.028	0.282 ± 0.037	0.137 ± 0.022	0.129 ± 0.027
细胞存活率(%)	84.4 ± 2.2	81.7 ± 1.8	46.2 ± 3.1	17.4 ± 2.6	0	0

注:在黑荆树悬浮细胞MS培养液中加入环己亚胺,低温驯化12 d。细胞存活率(%)是在 -6°C 测验的。未加环己亚胺、未进行低温驯化的正常培养12 d的悬浮培养细胞可溶性蛋白质含量OD值为 $0.153\ 8 \pm 0.026$ 。

2.6 环己亚胺对抗冻性发育的影响

环己亚胺在 5 mg/L 浓度时完全抑制可溶性蛋白质合成,也直接影响细胞抗冻性发育。在低温驯化过程中,在不同时间将驯化细胞转入到添加 5 mg/L 环己亚胺的培养液中,再继续驯化到第14天,随即测定细胞的抗冻能力,结果如图4。驯化开始时加入环己亚胺,抑制了可溶性

细胞在含5%、10%、15%蔗糖的MS培养液中进行低温驯化14 d,每2天取样分析细胞中蛋白质含量的变化,结果如图3。从图3中可以看出,未经低温驯化的悬浮培养细胞在含5%蔗糖MS培养液中的对照,其蛋白质含量没有显著的变化,而经低温驯化的3种蔗糖浓度处理,其蛋白质含量显著增高,但是尽管蛋白质含量增高的时间进程有差异,而最终其蛋白质含量还是达到同一水平,这表明蛋白质含量增高是低温驯化诱导的结果,而不是由蔗糖直接诱导的。

2.4 蛋白质含量与抗冻性

2.5 环己亚胺对蛋白质含量和抗冻性的影响

在悬浮细胞培养液MS中加入不同浓度的环己亚胺,在 2°C 、每天8 h光照下驯化12 d,测定其可溶性蛋白质含量

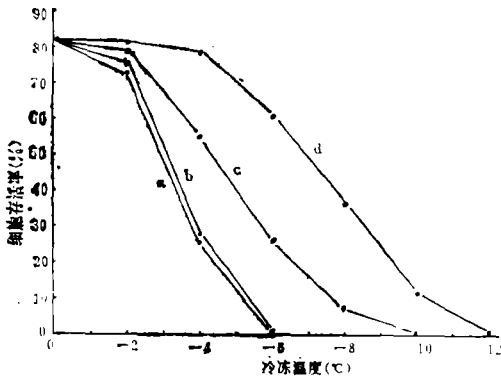


图4 环己亚胺浓度为5mg/L对黑荆树低温驯化悬浮细胞抗冻性发育的影响

- a. 未驯化的对照; b. 驯化开始时加入环己亚胺;
c. 驯化5 d后加入环己亚胺; d. 驯化10 d后加入环己亚胺。

化提高抗冻性。油菜^[4]、小麦^[5]、苜蓿^[6]等悬浮培养细胞进行低温驯化时所发生的形态、生理变化已作了许多研究,但在木本植物方面研究较少。Hellergrén^[7]对欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)悬浮培养细胞进行低温驯化,使 $L_{T_{50}}$ 从 -6.2°C 下降到 -16.4°C 。王敬文等^[2]低温驯化黑荆树悬浮培养细胞,使 $L_{T_{50}}$ 从 -2.5°C 下降到 -7.6°C ,并研究了脱落酸对细胞抗冻性的诱导作用(待发表)。利用悬浮培养细胞研究诱导抗寒力过程中的生理变化有相当的优越性,能够减少或排除在整株植物上由于细胞差异和器官特异性所造成的干扰,而且环境条件能够进行人工控制,细胞所经受的试验处理也都是均一的。

植物的抗冻基因是一种诱发性基因,只是在一定的条件下才能表达为抗冻力。低温驯化就是诱发抗冻基因表达,这不仅取决于外界的诱导条件——低温和短光照,而且与细胞的代谢活动有密切的关系。在诱发抗冻基因表达过程中,细胞代谢活动所发生的一系列变化,有些是相辅的变化,有些则是与抗寒基因表达提高抗冻能力直接相关的。低温驯化诱导悬浮培养细胞可溶性蛋白质含量增加(图2),可溶性蛋白质含量增加的时间进程与细胞抗冻能力增强的进程是同步的,环己亚胺抑制蛋白质含量增高,同时也抑制了细胞抗冻性发育(图4,表1),这就表明低温驯化诱导合成的这种可溶性蛋白质与细胞的抗冻性直接相关,是抗冻基因表达的产物。可溶性蛋白质的亲水胶体性质强,含量增加可显著加强细胞的保水力,更重要的是,Kacperska-Palacz等^[8]认为这类可溶性蛋白质主要是一些功能蛋白——酶,这些新合成的酶在性质和组成上都发生了变化,如其反应动力学的 Q_{10} 较低,这对于细胞的抗冻性都有其特异的作用。

糖在植物抗冻中虽有重要作用,但并不直接相关。Weiser^[9]曾对偃伏柞木(*Cornus stolonifera* Puall.)植株施用不同浓度的糖,对促进抗寒驯化没有效果。Siminovitch等^[10]曾指出黑刺槐树抗寒性增强与晚秋增加含糖量并不相关。Sakai(酒井,1968)在白杨树抗寒研究中也未找到含糖量与抗冻性之间的相关性。在本研究中,糖对黑荆树低温驯化细胞中可溶性蛋白质合成有促进作用,加快了蛋白质含量增加的时间进程,但并没有最终提高蛋白质含量水平(图2),这表明糖不是木本植物低温驯化诱导抗冻性的因子。

蛋白质合成,也抑制了抗冻性发育,细胞冷冻存活率和未经低温驯化的对照大致相同。驯化第6天加入环己亚胺,这一处理的细胞抗冻性明显增强,抗冻极限温度达到 $-9\sim-10^{\circ}\text{C}$ 。而在驯化第11天加入环己亚胺时,细胞的抗冻性已得以较充分的发育,耐受低温极限接近 -12°C ,这表明低温诱导的抗冻性发育在驯化第10天即接近完成。

3 讨 论

植物完整植株通过低温驯化能够提高抗寒力,植物悬浮培养细胞也能够通过低温驯

参 考 文 献

1. 简令成. 植物冻害和抗冻性细胞生物学研究. 植物生理生化进展, 1987, (5): 1~16.
2. 王敬文, 蒋晶. 黑荆树悬浮细胞低温驯化. 林业科学研究, 1989, 2(5): 442~446.
3. Lowry C H, Rosebrough N J, Tarr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, (195): 265~275.
4. Orr W, Johnson-Flanagan A M, Weller W A, et al. Induction of freezing tolerance in microspore-derived embryos of winter *Brassica napus*. Plant Cell Rep., 1990, (8): 570~581.
5. Chen P M, Gusta L V. Cold acclimation of wheat and smooth brome grass cell suspension. Can. J. Bot., 1982, (60): 1207~1211.
6. Borochoy A, Waiker L A, Pauls K P. Effects of cold acclimation on the morphological and Physiological properties of alfalfa (*Medicago sativa*) suspension culture cells. J. Plant Physiol., 1989, 133: 671~677.
7. Hellegrgen J. Cold acclimation of suspension cultures of *Pinus sylvestris* in response to light and temperature treatments. Plant Physiol., 1983, (72): 992~995.
8. Kacperska-Palacz A, Dlugokecka E, Breitenwald J, et al. Physiological mechanism of frost tolerance: Possible role of protein in plant adaptation to cold. Biol. Plant, 1977, 19: 10~12.
9. Weiser C J. Cold resistance and injury in wood plants. Science, 1970, (169): 1269~1278.
10. Siminovitsh D, Gffeller F, Dheaume B. The multiple character of the biochemical mechanism of freezing resistance of plant cells, --in Cellular Injury and Resistance in Freezing (E. Asahina, ed.) Hokkaido University, Sapporo, Japan, 1967. 97~117.

*Changes of Soluble Protein Content in Acacia mearnsii
Suspension-cultured Cells during Cold Acclimation*

Wang Jingwen Jiang Jing

Abstract Cell suspension cultures of *Acacia mearnsii* De Wild maintained at 2 °C, 8 h/d light for 14 days had much more freezing tolerance, and its LT₅₀ was lower from -3.4 °C to -8.2 °C. Cold acclimation induced the increase of soluble protein content, and its time course of increase was in accordance with the development of freezing tolerance. Cycloheximide inhibited both the increase of soluble protein and the development of freezing tolerance. During cold acclimation, if cycloheximide was added at different time, the inhibition effects on development of freezing tolerance were different. These results indicated that development of freezing tolerance was nearing completion at about the tenth day of acclimation period. Exogenous sugar accelerated the time course of increase of soluble protein, however it was ineffective on the increase of final total content of soluble protein. Sugar wasn't a factor for the induction of freezing tolerance in cold acclimation of *Acacia mearnsii*.

Key words *Acacia mearnsii*, suspension cell, cold acclimation, soluble protein, freezing tolerance

Wang Jingwen, Associate Professor, Jiang Jing (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400).