

甘蔗抗逆细胞系选择及其生化特性的研究

陈 晖 匡柏健 王敬驹

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

摘 要 利用脯氨酸类似物羟脯氨酸(Hyp)的生长抑制作用,筛选出抗 Hyp 的甘蔗(*Saccharum sinensis* Roxb.)细胞变异系 R932。抗性系体内游离脯氨酸含量超常积累($\times 3.2$)。而且其体内脯氨酸合成途径中的关键酶 γ -谷氨酸激酶对脯氨酸的反馈抑制较不敏感。R932 抗 PEG 和低温能力较供体加强。实验结果表明 γ -谷氨酸激酶特性的变化可能导致细胞内脯氨酸的过量积累,脯氨酸的过量积累有利于植物细胞对抗恶劣环境。

关键词 甘蔗,羟脯氨酸,谷氨酸激酶,组织培养,抗逆性

甘蔗(*Saccharum sinensis* Roxb.)属热带、亚热带作物。它喜高温,需水量大而且对低温甚为敏感,缺水和低温对甘蔗的产量和品质均产生严重的影响^[1,2],我国甘蔗种植面积很大,蔗区降雨分布不均匀而且气温变化也较大。所以旱害和寒害已成为影响我国甘蔗生产主要灾害。为了减轻干旱和低温的危害,我们希望应用细胞工程手段来选择耐干旱和低温等恶劣环境的甘蔗优良品系。

高等植物在逆境条件下常常反应出其体内超常积累脯氨酸^[3,4]。人们认为植物体内游离脯氨酸作为一种调渗物质在植物对抗外界环境胁迫时平衡细胞内外环境,保持细胞内环境的相对稳定。由于脯氨酸这一特殊的作用,已有一些学者开始研究富含脯氨酸的突变体对抗恶劣环境的行为和机理^[5-7]。用氨基酸类似物作选择剂来筛选过量合成相应氨基酸的细胞变异系的工作早在 70 年代就已经开始^[8]。本文报道筛选获得的甘蔗愈伤组织抗羟脯氨酸(Hyp)变异体耐 PEG 和低温胁迫的表现及其生化特性分析。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和抗性系选择

用甘蔗(*Saccharum sinensis* Roxb.)“台糖 F172”作实验材料。组织培养方法及愈伤组织诱变方法参照本实验室以前的报道^[9,10]。在含 6mmol/L Hyp 选择压力的培养基上反复选择-继代-选择,挑选存活细胞。获得抗 Hyp 的愈伤组织变异系 R932。

1.2 耐 PEG 和低温胁迫实验

1.2.1 继代培养 20 天的愈伤组织分别在含 0%、5%、10%、15%、20%、25%和 30%聚乙二醇(PEG 6 000)(W/V)的液体培养基中胁迫生长 10 天,连续重复 3 次,30 天后记录其愈伤组织增长率。

1.2.2 继代培养 30 天的愈伤组织分别在 -10°C 温度下处理 1、2、3 和 4 小时。低温胁迫

处理过的愈伤组织的损伤程度用电导率仪测得的相对电导率表示。同时对 0℃、14℃ 和 28℃ 温度下培养 60 小时的愈伤组织也作了相应的实验。

1.3 氨基酸分析

每个处理取继代培养 20 天的愈伤组织 1 克,用碘基水杨酸法提取游离氨基酸^[11]。用日立 835-50 型氨基酸分析仪作氨基酸定量分析。

1.4 酶的提取

以下操作在 4℃ 下进行。取继代培养 20 天的愈伤组织 1 克,加液氮冰冻,研磨,加 2ml TD 缓冲液(50mmol/L Tris 缓冲体系(pH7.5),1ml 二硫苏糖醇,10%(V/V)甘油)匀浆,匀浆液 $16\,000\times g$ 离心 20 分钟,去除细胞碎片沉淀物,上清液用 40%饱和硫酸铵(pH7.5)盐析, $16\,000\times g$ 离心 20 分钟,丢弃沉淀物,上清液用 80%饱和硫酸铵(调 pH7.5)盐析, $16\,000\times g$ 离心 20 分钟,去上清,用 2ml TD 缓冲液悬浮沉淀物,隔夜透析 18 小时(透析液为 TD 缓冲液)。收集透析物,即为酶粗提液。

1.5 γ -谷氨酸激酶特性鉴定

参照 Smith 方法^[12],酶粗提液中加 0.3ml 反应液(50mmol/L L-谷氨酸,10 mmol/L ATP,20mmol/L 氯化镁,100mmol/L 盐酸羟胺,50mmol/L Tris 缓冲液,调 pH7.5),调 pH7.0 于 3.7℃ 水浴中保温 30 分钟,然后加入 1ml 终止液(5.5%氯化铁,2.0%高氯酸,2mol/L 盐酸), $16\,000\times g$ 离心 3 分钟去除悬浮蛋白质。用分光光度计在 A_{535} 下,对照商品 γ -谷氨酰肼,得出 γ -谷氨酸激酶活力。1 活力单位定义为:每分钟生成 $1\mu\text{mol/L}$ γ -谷氨酰肼。用平行实验方法鉴定反应体系中加入 50mmol/L L-脯氨酸后 γ -谷氨酸激酶的特性。

蛋白质总量测定用 Lowry 方法^[13],以牛血清白蛋白做标准对照。

2 实验结果

2.1 愈伤组织抗 Hyp 及耐 PEG、低温的特性

2.1.1 抗 Hyp 特性:图 1 表示甘蔗抗 Hyp 变异系 R932 和供体 F172 愈伤组织在含不同浓度的 Hyp 培养基上生长情况。由于 Hyp 的毒害作用,R932 和供体愈伤组织生长受到了不同程度的影响。供体愈伤组织对 Hyp 极为敏感。当 Hyp 浓度增加到 6mmol/L 时,大部分细胞死亡,出现黑色愈伤组织块。此时变异系 R932 虽然生长也受到影响,但未出现明显的大面积死亡现象。当 Hyp 浓度加大到 8mmol/L 时,R932 愈伤组织的生长率为 49.2%,可是供体愈伤组织只有 16.0%。

2.1.2 忍耐 PEG 表现:图 2 表明甘蔗变异系 R932 和供体 F172 愈伤组织在含不同浓度的 PEG 培养基中的生长情况。在不同

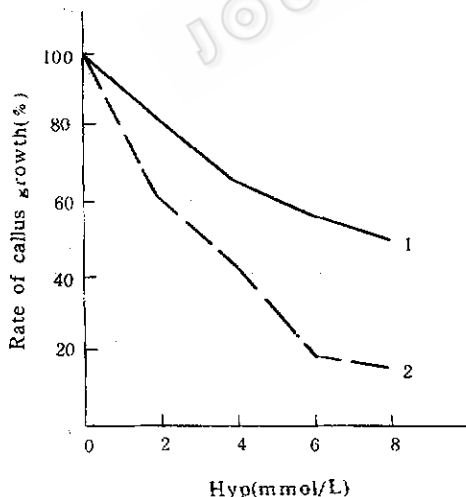


图 1 Hyp 对甘蔗愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effect of Hyp on growth of sugarcane callus

Fig. 1 to Fig. 4: 1. R932, 2. F172

PEG 浓度的胁迫下 R932 和供体 F172 愈伤组织表现了不同的反应能力。在较低浓度 PEG 胁迫下两者差异较小,当 PEG 浓度高于 10% 时,R932 和供体愈伤组织生长能力就出现较大的区别。差异最大的点在 PEG 浓度达到 25% 时,R932 愈伤组织增长率是供体 F172 的 2.7 倍。当 PEG 浓度升高到 30% 时,R932 愈伤组织增长率是 38.3%,而供体愈伤组织却只有 13.9%。

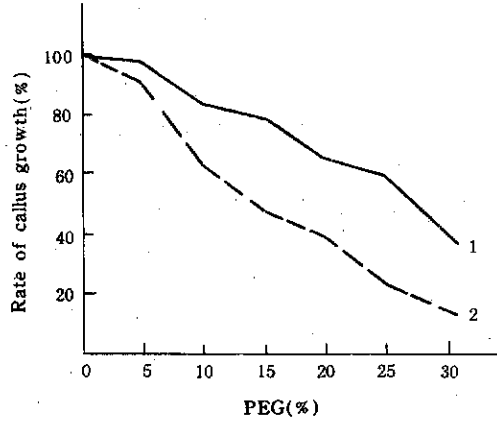


图 2 PEG 对甘蔗愈伤组织生长的影响
Fig. 2 Effect of PEG on growth of sugarcane callus

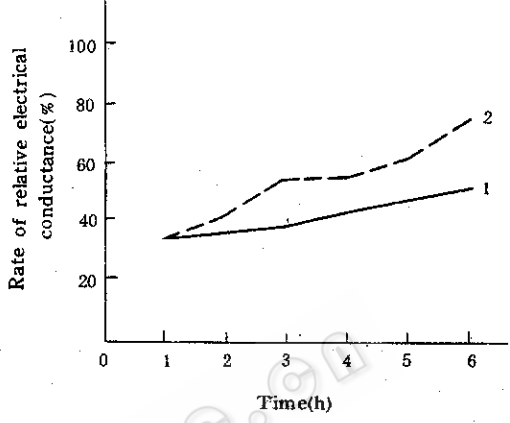


图 3 -10℃ 温度下甘蔗愈伤组织受伤害情况
Fig. 3 Damage of sugarcane callus under -10℃

表 1 甘蔗愈伤组织内游离氨基酸含量

Table 1 Contents of free amino acids in sugarcane callus

Amino acid	Content(mg)*		R932/F172
	F172	R932	
Asp	106	152	1.4
Thr	322	1354	4.2
Ser	212	525	2.5
Glu	304	635	2.1
Gly	64	115	1.8
Ala	1549	4473	2.9
Cys	40	66	1.7
Val	127	196	1.5
Met	17	21	1.2
Iso	44	68	1.6
Leu	79	133	1.7
Tyr	42	64	1.5
Phe	43	48	1.1
Lys	47	126	2.7
His	90	92	1.0
Arg	203	184	0.9
Pro	41	131	3.2
Total	3330	8383	2.5

* :Per 100g F. W Callus

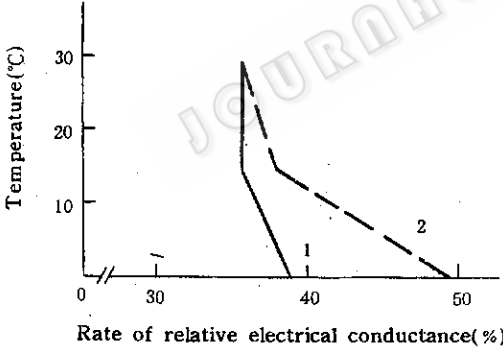


图 4 60 小时培养后甘蔗愈伤组织受损伤情况
Fig. 4 Damage of sugarcane callus after 60 hour culture

2.1.3 忍耐低温表现:图 3 表示甘蔗变异系 R932 和供体 F172 愈伤组织在温度 -10℃ 下处理 1、2、3、4、5、6 小时后的电导率变化。电导率变化间接反应了 R932 和供体愈伤组织的损伤程度。在温度 -10℃ 下这两个材料的愈伤组织都受到了损伤。

但是供体受损伤程度较大。图 4 表示培养材料在温度 0℃ 及 0℃ 以上的损伤情况。R932 愈伤组织在 0℃ 时相对电导率较供体的为小,说明 R932 愈伤组织比供体更耐 0℃ 低温。

2.2 游离氨基酸组分变化

表 1 列出了变异系 R932 和供体 F172 愈伤组织内游离氨基酸含量,从中可看到除精氨酸外,R932 体内所有的氨基酸组分均比供体高,其中有 6 种氨基酸分别提高了 2 倍以上。表现最为突出的是脯氨酸和苏氨酸,R932 体内的脯氨酸和苏氨酸分别比供体增加 3.2 和 4.2 倍。

2.3 γ -谷氨酸激酶特性

对变异系 R932 和供体 F172 细胞内 γ -谷氨酸激酶的特性进行分析,了解到 R932 细胞内的酶活力略高于供体($\times 1.186$),但是在反应体系中加入外源 50mmol/L 脯氨酸后,R932 体内 γ -谷氨酸激酶活力降低了 19%,而供体内 γ -谷氨酸激酶活力降低了 44%。这说明 R932 和供体 F172 体内 γ -谷氨酸激酶对合成产物脯氨酸的反馈抑制作用的反应有较大的差别。

表 2 甘蔗细胞内 γ -谷氨酸激酶特性
Table 2 Activity of γ -glutamyl kinase in sugarcane cell

Material	γ -glutamyl kinase activity (u/mg,protein)	
	Normal	Adding 50mmol/L L-proline
R932	126	102
F172	106	59
R932/F172	1.186	1.73

3 讨 论

运用细胞工程手段来达到改变植物某些性状的研究是植物育种工作的一部分。自从 70 年代开始用氨基酸类似物来筛选过量积累相应氨基酸的植物细胞变异系工作以来,人们通常都应用这种方法来选择富含有用氨基酸的变异体。脯氨酸在植物处于恶劣环境下的超常积累现象以及它的作用已经引起人们的注意。用羟脯氨酸(Hyp)作选择剂,筛选富含游离脯氨酸的植物突变体以提高植物抗逆性能的研究已有一些成功的报道^[6-7],经预实验,我们用 6mmol/L Hyp 作选择压力筛选出的抗 Hyp 变异系 R932 对 Hyp 有较大的耐受能力。比较 R932 和供体细胞内游离氨基酸组分,了解到 R932 细胞内氨基酸含量普遍提高,其中脯氨酸含量提高 3.2 倍。这与有关报道是一致的^[6,7]。

R932 细胞内脯氨酸的超常积累是其细胞内生化环境变化的表现。对 γ -谷氨酸激酶特性的鉴定结果表明,抗性系 R932 细胞内的 γ -谷氨酸激酶活力是供体 F172 细胞内的 γ -谷氨酸激酶的 1.2 倍,但这些变化不足以说明 R932 细胞内脯氨酸的超常积累现象,在对 γ -谷氨酸激酶受产物脯氨酸的反馈抑制进行鉴定实验时发现,在反应体系中加入 50mmol/L 外源 L-脯氨酸后,R932 细胞内 γ -谷氨酸激酶活力被抑制了 19%,而供体细胞内的 γ -谷氨酸激酶活力却被抑制了 44%。这说明 R932 细胞内 γ -谷氨酸激酶对脯氨酸明显地不敏感,而供体细胞内 γ -谷氨酸激酶在这方面的表现相差甚远。据此可以推测,R932 细胞内编码 γ -谷氨酸激酶的 proB 基因可能发生了变异,改变了其 γ -谷氨酸激酶的组成或特性,使该酶对反应终产物脯氨酸的敏感率减弱。从而促使变异系 R932 细胞内的脯氨酸超常积累。

细胞内游离脯氨酸积累的生理作用被认为是,脯氨酸作为调渗物质参与调节细胞的渗透势,提高组织持水能力^[14]。另外脯氨酸可影响蛋白质的亲水性,具有稳定蛋白质的作用^[15]。这些可能有利于细胞对干旱和低温等逆境的适应。变异系 R932 细胞内游离脯氨酸超常积累可能会加强其抗逆境能力,通过忍耐 PEG 和低温的实验,证明变异系 R932 无论是抗 PEG 或抗低温能力均比供体 F172 提高。这说明通过筛选富含脯氨酸的变异系来达到选择抗逆植物品系的工作是很有意义的。我们已经得到了 R932 的分化苗。对植株水平上的氨基酸表现,抗逆境能力要作进一步的研究,并且还要进行遗传分析和遗传变异的分子基础研究。

参 考 文 献

- [1] 陈少裕. 福建农学院学报, 1991, 20(1): 12—17.
- [2] 陈少裕. 福建农学院学报, 1992, 21(1): 22—26.
- [3] Csonka L N. Mol Gen Genet, 1981, 182: 82—86.
- [4] Stewart G R. In: Stumpp P K *et al* eds. The Biochemistry of Plants, New York: Academic Press, 1980, Vol. 5. pp.
- [5] 陈 晖等. 植物学报, 1991, 33(10): 738—743.
- [6] 郭 延等. 实验生物学报, 1992, 26(2): 101—107.
- [7] Kueh J S H *et al*. Planta, 1981, 153: 166—171.
- [8] Tidholm, J M *et al*. Biochem Biophysiol Acta, 1972, 261: 52—58.
- [9] 王敬驹等. 甘蔗糖业(甘蔗分册). 1983, 4, 11—15.
- [10] 王敬驹等. 植物学通报, 1983, 1(2): 17—19.
- [11] 朱广廉等. 植物学通报, 1984, 2(4): 47—50.
- [12] Smith C J A *et al*. J Bacteriol, 1984, 157(2): 545—551.
- [13] Lowry O H, *et al*. J Biol Chem, 1951, 193: 265—275.
- [14] Kayama Y K T *et al*. J Bacteriol, 1976, 128: 157—164.
- [15] Paleg L G *et al*. Plant Physiol, 1984, 75: 974—978.

Studies on Isolation and Characterization of a Stress Tolerant Cell Line of Sugarcane

Chen Hui Kuang Baijian Wang Jingju

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

Abstract A sugarcane cell line R932 (*Saccharum sinensis* Roxb.) was selected for resistance to growth inhibition by the proline analog hydroxyproline. R932 showed more tolerance to PEG, cold and freezing temperature than donor. Comparison of the free amino acid pool levels in the line R932 with those in the sensitive donor showed substantial accumulation of proline ($\times 3.2$). *In vitro* enzymic analysis of γ -glutamyl kinase involved in proline biosynthesis showed the enzyme in R932 was less sensitive to inhibitions of 50mmol/L exogenous proline than that in donor. The results showed that changes of γ -glutamyl kinase property may occur extra accumulation of proline, and the accumulation may favor to increase tolerance to environmental stress.

Key words Sugarcane, hydroxyproline, γ -glutamyl kinase, tissue culture, stress tolerance