第24卷 第5期 空 间 科 学 学 报 Vol.24, No.5
2004 年 9月 CHINESE JOURNAL OF SPACE SCIENCE Sept., 2004

赤霉素介导模拟失重诱导的胡萝卜细胞中淀粉粒降解*

崔大勇 蔡伟明 汤章城
(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200032)

摘 要

空间微重力环境会影响生命活动，本文利用回转器来模拟微重力 (失重) 的生物学效应. 回转处理可以引起胡萝卜愈伤组织细胞中内源活性赤霉素 (GAs) 水平上升，总淀粉酶活力提高 (其中主要是 α-淀粉酶活力增加)，淀粉粒降解. 且 GAs 和 α-淀粉酶活力的升高趋势一致. GAs 合成性抑制剂，ancymidol 能显著抑制回转处理中 α-淀粉酶活力的增加. 由此推测：回转处理中 GAs 的升高诱导了 α-淀粉酶基因表达增加，后者促使淀粉粒降解和能量物质动员，以响应模拟失重的刺激.

关键词 微重力；胡萝卜；赤霉素；淀粉酶；回转器

1 引言

国际空间站上的微重力水平约为 10^{-4}—10^{-6} g. 太空中特有的微重力对生物有很大的影响. 过去 30 多年的空间飞行实验显示，微重力可以在个体、器官、组织、细胞、亚细胞和生化活性等各级水平上影响植物体 [1],[2]. 1982 年 Merkys 等报道了在礼炮 7 号上全日照生长 69 天的 7 株植物，它们的所有形态均小于地面对照. 其中 5 株产生 22 个正常荚果，2 株产生无胚珠荚果. 在太空共获 200 粒种子，其中正常种子占 42%，而地面对照为 67.7%[3]. 生长在飞行器 STS-54 的拟南芥植株，虽然 80% 的花粉粒是可育的，但仍生成不少空的皱缩的荚果 [4]. 在和平号轨道站上首次获得太空条件下培育的小麦种子，但结实率很低 [5]. 植株根部感受重力的根冠，在微重力条件下不能再生. 细胞中的内膜系统也受到空间飞行因素的影响，质粒、类囊体、内质网和线粒体都发生了变化. 空间植物的染色质出现聚合，细胞核中的核仁增多，细胞壁变薄，纤维素、木质素以及木质素合成代谢过程中的酶活性都下降.

空间绝无仅有的长期失重环境为向重性研究提供了有利条件. 植物向重性研究已成为空间生命科学中的研究热点. 美国航空航天局 (NASA) 在空间生物学和医学 21 世纪的研究战略中，就将植物向重性及其机理研究列为首选课题. 在重力对生物系统效应的研究过程中，生长素是研究最早和最为深入的一类植物激素，许多研究均表明它参与了植物的向重性反应 [6],[7]. 但也有研究指出，改变重力方向除了引起生长素的分布不均外，氢离子、钠离子、镁离子、氯离子、三磷酸肌醇 (IP_3) 和赤霉素 (GAs) 等也出现类似的情况 [8]–[12].

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-322) 和国家自然科学基金项目 (39770199) 共同资助
2003-12-26 收到原稿，2004-05-25 收到修定稿

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

GAs 作为一种重要的植物激素，可以影响植物生长、发育和分化的各个方面 [13]. 许多基因的表达，如 α-, β-微管蛋白 [14] 、查儿酮合成酶 [15], 还有本文涉及到的 α-淀粉酶 [16] 都受其调控. 本文进一步阐述了模拟失重导致的 GAs 介导的应激反应.

2　材料和方法

2.1　胡萝卜愈伤组织细胞的培养

胡萝卜的愈伤组织细胞，培养在附加 2, 4-D (2 mg/L), 用 0.9% 琼脂固化的 MS 培养基上. 样品均培养在 25°C 黑暗环境中.

2.2　模拟失重效应与抑制剂处理

按 Silver 的方法，用 2 r/min 的 1π 回转器 (中国科学院上海植物生理研究所研制) 进行模拟失重效应实验 [17]. 将接种有胡萝卜愈伤组织细胞的三角瓶固定于回转器的回转圆套中，回转器置于 25°C 温室并在黑暗条件下回转. 取出回转过不同时间的胡萝卜愈伤组织细胞用液氮迅速冷冻，进而分析赤霉素活性和淀粉酶活力. 抑制剂处理实验中，用 30 μmol/L 的 GAs 抑制剂 ancymidol 处理胡萝卜细胞 2 d, 再继续进行相应的回转处理后，取材测定 α-淀粉酶的活力.

2.3　电子显微镜下的淀粉粒观察

取经过回转 1 d、3 d 和对照的胡萝卜愈伤组织小块，置于 2.5% 戊二醛溶液中进行初固定. 在光学显微镜下切取目的小细胞团作为电镜样品. 以戊二醛-锇酸双重固定，梯度酒精脱水，环氧丙烷过渡，Epon 812 包埋，包埋块在 60°C 固定 2 d, 用 LKB-Ⅲ 切片机切片，醋酸铀-柠檬酸铅双重染色，最后用 S-450 (HITACHI, Japan) 电镜观察、拍片记录.

2.4　GAs 的提取及测定

培养 2 d 后的胡萝卜愈伤组织细胞，在回转器上分别作处理 6 h、24 h、72 h、144 h, 从中各取 2 g 材料，置于液氮中研磨，加入 0.5 mL TBS (Tris 800 mg/L, $MgCl_2 \cdot H_2O$ 20 mg/L, NaCl 60 mg/L, NaN_3 10 mg/L) 和 0.5 mL 丙酮，4°C, 10 000 g 离心，取上清. 放置于 −70°C 冰箱备用.

按 Varner 等提供的方法对样品进行 GAs 分析 [18]. 以单位时间单位鲜重愈伤组织 [g^{-1}(FW)·min^{-1}] 中 GAs 诱导麦胚分解淀粉产生麦芽糖的量 (mg) 作为定量 GAs 活性标准 [mg·g^{-1}(FW)·min^{-1}].

2.5　淀粉酶的提取与测定

培养 2 d 后的愈伤组织细胞，在回转器上分别处理 8 h、24 h、72 h、144 h. 然后各取 1 g 材料，液氮研磨，用 1 ml 柠檬酸缓冲液抽提淀粉酶，4°C, 12 000 g 离心，取上清.

参照《现代植物生理学实验指南》 [19] 测定总淀粉酶比活力，以单位时间 (min) 愈伤组织中单位总蛋白 (mg) 催化淀粉降解成麦芽糖的产量 (mg) 作为定量淀粉酶活力的标准 (mg·mg^{-1}·min^{-1}).

2.6　α-淀粉酶的提取与测定

提取方法同上. 测定时，样品被置于 70°C 温浴 15 min, 使 α-淀粉酶失活. 活力测定方法同上.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3 结果

3.1 回转处理对胡萝卜愈伤组织细胞中淀粉粒的影响

如图 1 所示，与对照图 1(a) 相比较，回转处理 1 d 后，胡萝卜愈伤组织细胞中淀粉体内的淀粉粒开始被降解，如图 1(b) 所示，到 3 d 时，淀粉粒进一步被降解，它们中许多已出现中空，如图 1(c) 所示.

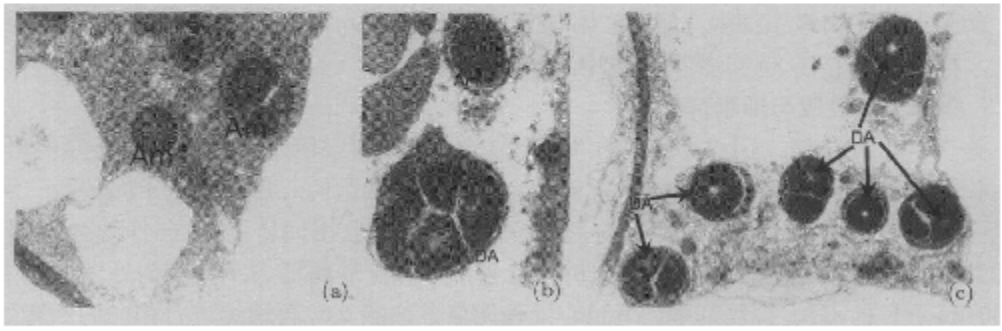


图 1 回转处理对胡萝卜愈伤组织细胞中淀粉体的影响
(Am 表示淀粉体，DA 表示淀粉粒降解中的淀粉体. 箭头指示的是降解的淀粉粒)
(a) 对照，本见淀粉体中淀粉粒的降解，×7000. (b) 回转处理 1 d，此时淀粉粒开始降解，×12 000.
(c) 回转处理 3 d，此时淀粉粒进一步降解，中部已中空，×4400

Fig.1 The effect of clinostat treatment on the amyloplasts in carrot callus cells
(Am: amyloplasts. DA: decomposed amyloplasts. Arrows show decomposed starch grains)
(a) control, starch grains were not decomposed, ×7000; (b) clinostat treatment for 1 d, starch grains began to be decomposed, ×12 000;
(c) clinostat treatment for 3 d, starch grains were further decomposed, ×4400

3.2 回转处理对 GAs 活性的影响

经回转处理后的胡萝卜愈伤组织细胞，其内源 GAs 的活性会升高. 从图 2 可以看出处理 6 h 时，其内源 GAs 活性已开始升高，到约 72 h 时达到最高，144 h 时是下降的.

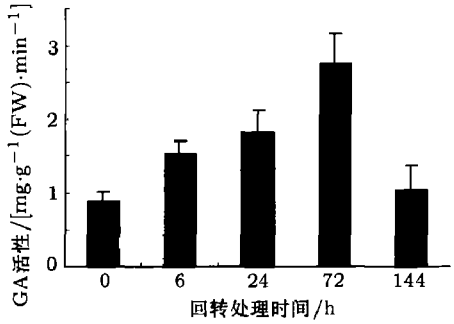


图 2 回转处理对胡萝卜愈伤组织细胞中 GAs 活性的影响，结果为 3 次实验的平均值 ±SD

Fig.2 The effect of clinostat treatment on the GAs activity in carrot callus cells
Data represent the means±SD from 3 experiments

3.3 回转处理对总淀粉酶活力的影响

胡萝卜愈伤组织细胞经回转处理 8 h，其中总淀粉酶活力已开始上升，2 d 时达到更高，4 d 已开始下降 (见图 3).

以在去蔗糖培养基上培养的胡萝卜愈伤组织细胞为实验材料，分析模拟失重对该材料的影响. 从图 3 可以看出经回转处理后，总淀粉酶活力与对照相比较，增加的幅度非常大，增量达到对照的 8 倍多. 比回转处理引起的培养在有糖培养基上的胡萝卜愈伤组织细胞中总淀粉酶活力的增加幅度还要高得多.

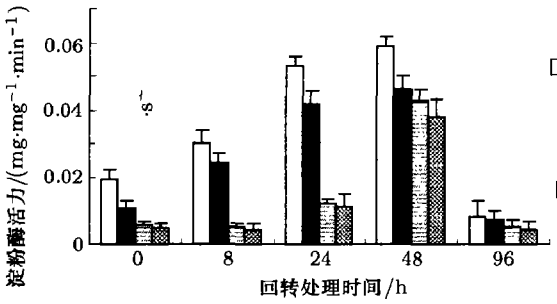
3.4 回转处理对 α-淀粉酶活力的影响

从图 3 可以分析到，胡萝卜愈伤组织细胞

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

回转处理 8 h, α-淀粉酶活力已上升，到 2 d 时达到更高， 4 d 时下降了.

也可以在去蔗糖培养基上培养的胡萝卜愈伤组织细胞为实验材料，分析模拟失重对该材料中 α-淀粉酶活力的影响. 从图 3 中可以看出经回转处理后， α-淀粉酶活力与对照相比较，增加的幅度也非常大，增量达到对照的 8 倍多. 比回转处理引起的培养在有糖培养基上的胡萝卜愈伤组织细胞中 α-淀粉酶活力的增加幅度还要高得多.



□: 培养在含蔗糖培养基上的细胞，回转处理对总淀粉酶的影响.
callus cells cultured on MS containing sugar, the effect of clinostat treatment on total amylase activity

■: 培养在含蔗糖培养基上的细胞，回转处理对 α-淀粉酶活力的影响.
callus cells cultured on MS containing sugar, the effect of clinostat treatment on α-amylase activity

▨: 培养在去蔗糖培养基上的细胞，回转处理对总淀粉酶的影响.
callus cells cultured on sugar-free MS, the effect of clinostat treatment on total amylase activity

▩: 培养在去蔗糖培养基上的细胞，回转处理对 α-淀粉酶的影响.
callus cells cultured on sugar-free MS, the effect of clinostat treatment on α-amylase activity

图 3　回转处理对胡萝卜愈伤组织细胞中淀粉酶活力的影响 (结果为 3 次实验的平均值 ±SD)

Fig.3　The effect of clinostat treatment on amylase activity in carrot callus cells. Data represent the means±SD from 3 experiments

3.5　GAs 抑制剂对 α-淀粉酶活性的影响

图 4 为用 30 μmol/L 的 ancymidol 处理胡萝卜愈伤组织细胞 2 d, 继续经回转器处理后的 α-淀粉酶活力，结果为 3 次实验的平均值 ±SD. 从图 4 可以看出，应用 GAs 生物合成性的抑制剂 ancymidol 处理胡萝卜愈伤组织细胞后再作回转处理，与没有使用 ancymidol 的回转材料相比较，其中回转诱导增加的 α-淀粉酶活力明显被抑制.

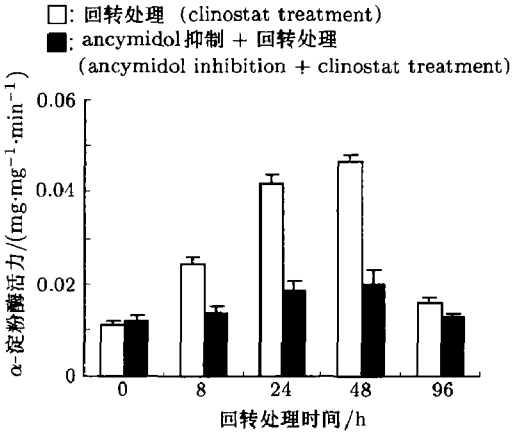


图 4　GAs 合成性抑制剂 ancymidol 减弱回转处理对 α-淀粉酶活性的影响

Fig.4　Ancymidol, the inhibitor of the biosynthesis of GAs, depresses the effect of clinostat treatment on α-amylase activity in carrot callus cells

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4 讨论

植物体内受微重力最直接影响的是重力感受器. 植物根冠及下胚轴内皮层中的淀粉体作为植物的重力感受器, 已被广大科研者所认同 [20]–[22]. 在美国 Endeavour 号航天飞机上培养的经松胞菌素处理过的三叶草小苗, 相对地面对照发生了内质网膜的错位和淀粉粒漂离远端质膜的变化. 生长在礼炮 -7 的豌豆叶中缺少淀粉的储藏 [23]. 经过空间飞行后, 大豆小苗细胞内的淀粉体分布发生变化, 其内的淀粉含量下降 [24]. 我们的电镜分析结果也证实模拟失重可以引起淀粉体的降解. 提取这些淀粉体, 对它体外进行 α-淀粉酶酶解分析, 发现其与地面对照相比较, 更易被降解 [23]. 我们试图分析其中的原因, 通过测定胡萝卜愈伤组织细胞中总淀粉酶的活力, 发现经回转处理后, 其活力上升, 在 2 h 约是对照的 4 倍. 由于淀粉酶有 α、 β 两种类型, 我们又进一步分析了 α-淀粉酶的活力, 发现它的活力发生了相应的增加, 从而造成了总淀粉酶的活力显现出增加, 而 β-淀粉酶活力在有无回转处理的胡萝卜愈伤组织细胞中几乎是不变的. 由于许多类型的糖分子, 如蔗糖、葡萄糖等都可以抑制 α-淀粉酶基因的表达 [25]–[27]. 为避免培养基中的外源糖分子对 α-淀粉酶基因表达的抑制, 我们以去蔗糖培养基培养的胡萝卜愈伤组织细胞为实验材料, 发现回转处理可以在更大程度上引起 α-淀粉酶活力的增加. 从以上结果初步推测 α-淀粉酶的活性增加在回转处理诱导的淀粉粒降解过程中起了一定作用.

由于 GAs 可以诱导 α-淀粉酶基因表达 [28],[29], 而且改变重力刺激方向, 可以引起 GAs 重新分布 [9]. 为了进一步探讨 α-淀粉酶活性升高的机理, 我们测定胡萝卜愈伤组织细胞内源 GAs 的活性, 结果发现经回转处理后, 细胞内源 GAs 的活性在较短的时间内升高, 且其变化趋势与 α-淀粉酶活力改变一致. ancymidol 作为一个理想的 GAs 合成性抑制剂在许多实验中所应用 [30],[31]. 为了进一步说明 α-淀粉酶活性升高是由 GAs 诱导, 我们又用该抑制剂来进一步分析. 结果显示它能显著抑制回转处理诱导的 α-淀粉酶活力的升高. 因此推测回转诱导该酶活力的升高是由 GAs 所介导的.

长期生长在地球上的植物, 已发展出适应 1 g 重力的机制. 人为地回转处理对这些植物来说, 将会引起一系列的应激反应. 其中可能途径是 GAs 的活性增加诱导了 α-淀粉酶活力升高, 触发淀粉体内淀粉粒的降解, 可溶性糖的增加, 以及 Hampp 等所发现的 NADH/NAD 比值升高, ATP/ADP 比值强烈的波动 [32], 这样植物体就可以产生更多的能量来应答这一环境刺激.

致谢 高小彦先生在电镜观察和制片方面的帮助.

参 考 文 献

[1] Halstead T W, Dutcher F R. Plant in space. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1987, **38**:317—345

[2] West J B. Physiology in microgravity. *J. Appl. Physiol.*, 2000, **89**(1):379—384

[3] Merkys A J, Laurinavichius R S. Complete cycle of individual development of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Plants on board the "Salyut-7" orbital station. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1983, **271**(2):509—512

[4] Kuang A *et al.* Reproductive development of *Arabidopsis thaliana* under space flight conditions. *ASGSB Bull.*, 1994, **8**:130

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

[5] Mashinsky A *et al.* From seed to-seed experiment with wheat plants under span-flight contions. *Adv. Space Res.*, 1994, **14**(11):13—19

[6] Evans M L *et al.* The role of calcium in the regulation of hormone transport in gravistimulated roots. *Adv. Space Res.*, 1992, **12**(1):211—218

[7] Philippar K *et al.* Auxin-induced K^+ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**(21):12 186—12 191

[8] Hestnes A. Distribution of radioactivity from exogenously supplied carbon-14 labelled IAA and tritium labelled gibberellin A-1 in geotropically stimulated Piceaabies roots. *Ann. Bot.*, 1979, **44**:567—574

[9] Rood S B *et al.* Gibberellins and gravitropism in maize shoots: endogenous gibberellin-like substances and movement and metabolism of [3H] Gibberellin A20. *Plant Physiol.*, 1987, **83**:645—651.

[10] Moor R *et al.* The influence of microgravity on root-cap regeneration and the structure of columella cells in Zea mays. *Amer. J. Bot.*, 1987, **74**:216—221

[11] Gehring *et al.* Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature*, 1990, **345**:528—530.

[12] Imara Y P, Ingo H E, Wendy F B. Transient and sustained increases in inositol 1, 4, 5-trisphosphate precedes the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**(10):5843—5853

[13] Hooley R. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.*, 1994, **26**(5):1529—1555

[14] Mendu N, Sliflow C D. Elevated levels of tubulin transcripts accompany the GA_3-induced elongation of oat internode segments. *Plant Cell Physiol.*, 1993, **34**:973—983

[15] Weiss D *et al.* Gibberellic acid regulates chalcone synthase gene transcription in the corolla of Petunia hybrid. *Plant Physiol.*, 1992, **98**:191—197

[16] Kaneko M *et al.* The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiol.*, 2002, **128**(4):1264—1270

[17] Silver I L. The dynamics of a discrete geotropic sensor subject to rotation-induced gravity compensation. *J Theo. Biol.*, 1976, **1**:353—362

[18] Varner B J E, Chabdra G R. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1964, **4**(1):100—106

[19] Zhou Peiyun. The assay of α- and β-Amylase Activity. In: Tang Zhancheng ed. Modern Plant Physiology: a Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 1999. 123—124. in Chinese (周蓓芸. α- 和 β- 淀粉酶活性的测定. 见: 汤章城主编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 123—124)

[20] Kiss J Z *et al.* Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.*, 1996, **97**(2):237—244

[21] Fukaki H *et al.* Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropis is in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 1998, **14**(4):425—430

[22] Fujihira H *et al.* An agravitropic mutant of Arabidopsis, endodermal-amyloplast less 1, that lack amyloplasts in hypocotyls endodermal cell layer. *Plant Cell Physiol.*, 2000, **41**(11):1193—1199

[23] Aliyev Z K *et al.* The ultrastructure and physiological characteristics of the photosynthesis system of shoots of garden peas grown for 29 days on the "Salyut-7" space station. *USSR Space Life Sci. Dig.*, 1987, **10**:15—16

[24] Kuzentsov O A C *et al.* Composition and physical properties of starch in microgravity-growth plants. *Adv. Space Res.*, 2001, **28**(4):651—658

[25] Perata P *et al.* Sugar repression of gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *Plant Cell*, 1997, **9**(12):2197—2208

[26] Lu C A, Lim E K, Yu S M. Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**(17):10 120—10 131

[27] Loreti E *et al.* Glucose repression α-amylase in barley embryos is independent of GAMYB transcription. *Plant Mol. Biol.*, 2000, **44**(1):85—90

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

[28] Suzuki Y *et al.* A role for arabinogalactan proteins in gibberellin-induced alpha-amylase production in barley aleurone cells. *Plant J.*, 2002, **29**(6):733—741

[29] Nakayama A *et al.* Immunohistochemistry of active gibberellins and gibberellin-inducible alpha-amylase in developing seeds of morning glory. *Plant Physiol.*, 2002, **129**(3):1045—1053

[30] Schomburg F M *et al.* Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, 2003, **15**(1):151—163

[31] Pereira-Netto A B *et al.* Inhibition of growth of microcultured Hancornia speciosa shoots by 3 beta-hydroxylated gibberellins and one of their C-3 deoxy precursors. *Plant Cell Rep.*, 2003, **21**(5):491—496

[32] Hampp R *et al.* Fusion and metabolism of plant cells as affected by microgravity. *Planta*, 1997, **203**(Supp):S42—S53

GIBBERELLINS MEDIATE THE DEGRADATION OF STARCH GRAINS INDUCED BY SIMULATED MICROGRAVITY IN CARROT CALLUS CELLS

CUI Dayong CAI Weiming TANG Zhangcheng

(*Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200032)

Abstract

Microgravity environment in space affects organism. The biological effects of microgravity have been used a clinostat to simulate. The clinostat treatment induced the increase of gibberellins (GAs) and the activity of total amylase (especially the increment of α-amylase activity), as well as the degradation of starch grains in carrot callus cells. The increment trend of GAs and α-amylase activity was consistent. Further more, ancymidol, the inhibitor of the biosynthesis of GAs could remarkably repress the increment of α-amylase activity induced by the clinostat treatment. Therefore, we deduce that clinostat treatment can stimulate the raise of GAs, which induces the increment of the expression of α-amylase genes, then triggers the degradation of starch grains. As a result, plant can produce more active energy to respond to clinostat stimulus.

Key words Microgravity, Carrot, Gibberellins, Amylase, Clinostat

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com