

水稻懸浮細胞對逆境之反應

曾梅慧* 童武夫**

*台北市立師範學院數理教育學系

**國立臺灣師範大學生物學系

摘 要

本研究是以逆境處理來探討水稻細胞在逆境下的生長及生理反應。逆境處理包括在培養基中添加20 mM NaCl、1.63 μ M H₂O₂及真菌抽出物，也使用去除含磷成份之培養基。逆境處理都普遍會抑制細胞生長並降低細胞內可溶性蛋白質含量，但在影響程度上有差別。從蛋白質的電泳分析，可以觀察到在缺磷條件下，雖然蛋白質總量大幅降低，仍有新的蛋白質(26 Kd)的出現，而且分子量59 Kd蛋白質含量也會增高，甚至釋出細胞外的35 Kd蛋白質也有明顯增加。鹽逆境下細胞的生長並無明顯受到抑制，但促使細胞內超氧歧化酶、觸媒酶、過氧化氫酶活性的增高，並促進酸性磷酸酶的分泌。真菌抽出物也一樣能促使超氧歧化酶及過氧化氫酶活性增高，但不影響酸性磷酸酶活性。缺磷逆境下細胞生長受到抑制，細胞內可溶性蛋白質也明顯降低，然而酸性磷酸酶活性無論是細胞外或細胞內卻大幅增高；從異構酶分析中發現有新異構酶的出現，然而反映酶活性的增高應是細胞內的AP I 及細胞外的APO1異構酶。這些結果顯示細胞會藉生理代謝的改變來適應不同逆境，以求取生存。

關鍵詞：水稻細胞、逆境、酶活性誘導

緒 言

植物的生長與發育受到內在遺傳機制的調節，然而外在環境因子也會誘導植物形態及生理發生顯著的改變，使植物能在不良環境中繼續生存。磷對於植物呼吸作用、醣類代謝、核酸代謝及細胞膜構造中具相當重要的生理、生化功能(Marschner, 1986)。在演化過程中植物細胞內出現一種缺磷誘導(phosphate-starvation-inducible)基因，使植物在缺磷環境中有一套緊急援助系統，確保獲取足夠的磷(Hahlbrock and Scheel, 1989)。在植物的防禦系統中，植物細胞膜上通常有特定的接受體(receptor)，可以辨識不相容病原(incompatible pathogens)(Bruegger and Keen, 1979)，並在植物體內產生訊息

傳遞而誘發細胞核內與防禦有關基因(defense-related genes)的表現(Somssich *et al.*, 1989)。目前已有研究指出來自微生物的一類物質(elicitor)與植物細胞膜上的接受體結合後，會激起植物的防禦反應(Yoshikawa *et al.*, 1993)。當植物面臨鹽逆境時，其基因的總體表現會發生變化，有些基因的表現受到抑制，也有些基因則被誘導而表現。如柑橘植物細胞或培養組織在鹽逆境下，一種與鹽逆境有關的蛋白質(salt-stress-associated protein)會被誘導增加(Holland *et al.*, 1993)。在有氧代謝的生物體內，superoxide radical(O₂⁻)會在細胞內不同的位置經由酵素(enzymatic)或非酵素(non-enzymatic)作用產生(Hassan and Scadalions, 1990)。O₂⁻在細胞內會導致

相當嚴重的破壞，因此細胞必須將這些 O_2^- 加以代謝處理以化解其毒害。超氧歧化酶、觸媒酶及過氧化氫酶三種即為細胞內參與化解 O_2^- 的毒害之主要酵素 (McCord and Fridovich, 1969, Huang, *et al.*, 1983, Fridovich, 1978)。酸性磷酸酶能水解多種磷酸脂類，雖然對受質的專一性不同，但都以磷酸根為共同水解產物，細胞可藉酸性磷酸酶活性之調節來維持細胞內磷酸根池 (pool) 之穩定 (Shaw, 1966)。本研究乃探討在培養環境中以缺磷、鹽、過氧化氫及真菌抽出物 (Fungal elicitor) 等不良外加因子處理水稻細胞，來觀察細胞的生長、蛋白質含量及酵素活性等變化，以瞭解植物細胞因應環境變化的生理反應。

材料與方法

材料及細胞培養

水稻 (*Oryza sativa* cv. Tainan 5) 懸浮細胞由中央研究院分子生物研究所余淑美博士提供。此種水稻細胞為未分化的細胞。於無菌操作台中將水稻細胞轉換至 Murashige and Skoog Medium (MS) 培養基，在 30 ml 培養基內接種約 0.3 克細胞，置 150 rpm 振盪條件下生長，溫度為 30°C，黑暗中進行培養，每隔七天繼代培養一次。分別以不同濃度的 H_2O_2 、真菌抽出物 (Fungal elicitor) 及 NaCl 逆境處理，結果發現細胞分別在 20 mM NaCl、1.63 μ M H_2O_2 及含 3.3% (v/v) 真菌抽出物的培養基中，生長情況較好，因此選擇以這些逆境及培養基中除去含磷成份作為細胞生長的逆境處理。

真菌抽出物 (Fungal elicitor) 之製備

以水稻紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 絲接種在 potato dextrose agar 培養基上，在 25°C 下培養 7 天。真菌抽出物製作是參考 Kombrink 及 Hahlbrock (1986) 之方法，取一塊含菌絲體的培養基在無菌狀態下移至 V8 液態培養基中，再以 25°C，120 rpm 振盪培養 14

天。收集含菌絲之培養液，離心 (8000xg) 15 分鐘，倒除上清液，並重複兩次之蒸餾水清洗菌絲團。加入 100 ml 蒸餾水並振盪菌絲團使懸浮，然後進行高壓滅菌。滅菌後的菌液，用離心法 (8000xg，15 分鐘) 去除菌絲，收集上清液再高壓滅菌。滅菌後的上清液置 4°C 冷藏備用。

細胞鮮重的測定

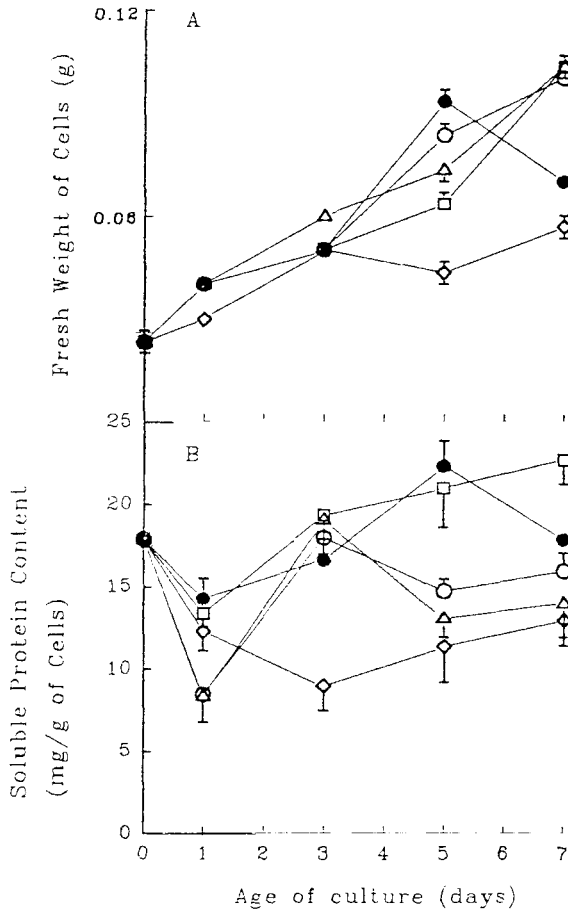
繼代培養後第一、三、五、七天，自培養基中取出 2 ml 的細胞懸浮液，裝入已稱過重的微量離心管內，經 4°C、8000xg 離心 10 分鐘，倒出上清液且吸乾殘餘培養液，稱出細胞與微量離心管的重量，以計算細胞的鮮重。

酵素活性的測定

超氧歧化酶活性測定是參考 Giannopolitis 和 Ries (1977) 的方法；準備乾淨玻璃試管依序編號，每組都有一試管以鋁箔紙包住作為空白試管。每一試管依序加入下列試劑 0.2 ml 的 0.05 mM Sodium carbonate、0.3 ml 的 2.8×10^{-5} M riboflavin、0.02 ml 的細胞萃取液 (空白試管內加入等量蒸餾水) 及 0.5 ml 的 63 μ M Nitro blue tetrazolium，搖勻置於 30°C 培養箱中，打開燈光後計時反應十分鐘，以黑布遮蓋試管，再測定每管 OD₅₆₀ 值，以抑制 50% 的 NBT 之光還原反應 (photoreduction) 為一酶活性單位。

酸性磷酸酶活性測定是根據 Bergmyer (1963) 的方法；預備 0.6 ml 的受質溶液 (0.1 M Na-acetate pH 5.0 含 1 mM EDTA 及 3 mM p-nitrophenyl phosphate disodium)，置於 30°C 水浴中預溫 10 分鐘，加入 20 μ l 的細胞萃取液，混合均勻置於 30°C 水浴中反應 1 分鐘後，加入 0.4 ml 的 0.05 M Sodium carbonate 以終止反應，立即在波長 400 nm 下測吸光度，每分鐘吸光度上升 1.0 為一酶活性單位。

觸媒酶活性測定是根據 Chance 和 Maehly (1955) 的實驗方法；準備 0.6 ml 的 0.067 M 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 含 0.07% H_2O_2 ，加入 10 μ l 的細胞萃取液後立即在波長 240 nm 下測其在一分鐘內吸光度降低的



圖一、逆境對水稻細胞生長及細胞內可溶性蛋白質含量之影響。A. 細胞鮮重之變化 B. 細胞內可溶性蛋白質含量之變化。(●), MS 培養基; (○), 含鹽(20 mM NaCl)之MS培養基; (□), 含過氧化氫(1.63 μM H₂O₂)之MS培養基; (Δ), 含真菌抽出物之MS培養基; (◇), 缺磷之MS培養基

速度，每分鐘吸光度下降1.0為一酶活性單位。

過氧化氫酶活性的測定乃參考 Gove 和 Hoyle(1975)的方法；以0.05 ml的0.2 M磷酸緩衝溶液(pH7.0)及0.1 ml的0.02 M guaiacol混合成反應溶液，加入20 μl的細胞萃取液，於30°C的水浴中反應30分鐘後，加入5 μl的0.3% H₂O₂混合均勻立即於470 nm波長下。測其在一分鐘內吸光改變的速率，每一活性單位相當於0.06 A/sec。

細胞之萃取液是取1 g 細胞加入10 ml之50 mM

tris-HCl buffer(pH7.5) 含1 mM EDTA 及1 mM Mercaptoethanol，並加入0.2 g Polyvinylpyrrolidone。以KINEMATICA polytron在冰浴中打碎細胞，經4°C、8000xg離心5分鐘，將上清液或培養液通過Sephadex G-25管柱(直徑1公分，長5公分)並量出濾液總體積，置於碎冰浴中備用。

蛋白質含量的測定及電泳分離

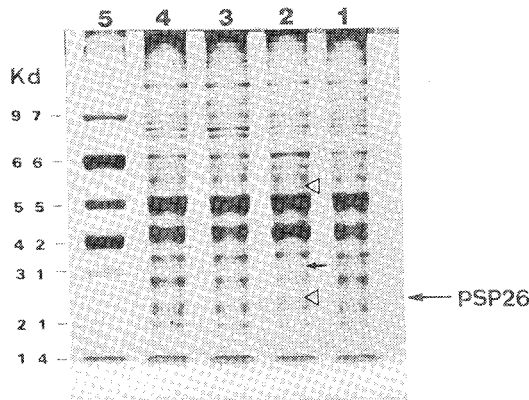
細胞萃取液中可溶性蛋白質含量是以Comassie brilliant blue G-250試劑加以測定(Bradford, 1970)。聚丙烯醯胺膠體電泳法是參考Davis(1964)的方法加以修改，以10% SDS PAGE作為電泳膠片，在電壓為50 V先跑30分鐘後，再將電壓設定150 V，電泳時間約1~1.5小時完成。膠片之呈色，乃根據Sasse和Gallagher (1992)的硝酸銀染色法進行。

結 果

逆境對細胞生長及細胞內可溶性蛋白質含量的影響

培養水稻細胞過程中，我們取細胞之鮮重作為細胞生長狀況的指標。未處理的細胞在繼代培養後第三天至第五天生長速率最快，有逆境處理的細胞則在第五天時的鮮重明顯比未處理細胞的鮮重少，顯然地在第三天至第五天培養期間，細胞生長受逆境抑制最為明顯。但到第七天時除了缺磷細胞，所有逆境處理的細胞鮮重都持續增加，此情形和未處理細胞在第七天時細胞鮮重下降並不一致(圖一A)。這可能因第五天時正常培養基內的大部份養分已被消耗待盡，導致細胞開始老化而生長速率降低，然而加鹽、過氧化氫及真菌抽出物處理的細胞則仍有顯著的鮮重增加，可是細胞的生長較慢且延後到第七天。缺磷處理的細胞在第三天後就已停止生長。如果處理NaCl及H₂O₂的濃度提高至400 mM及5.44 μM以上會使細胞顏色由正常的淡黃色轉變為白色而死亡。

水稻細胞生長期間，細胞內可溶性蛋白質的含

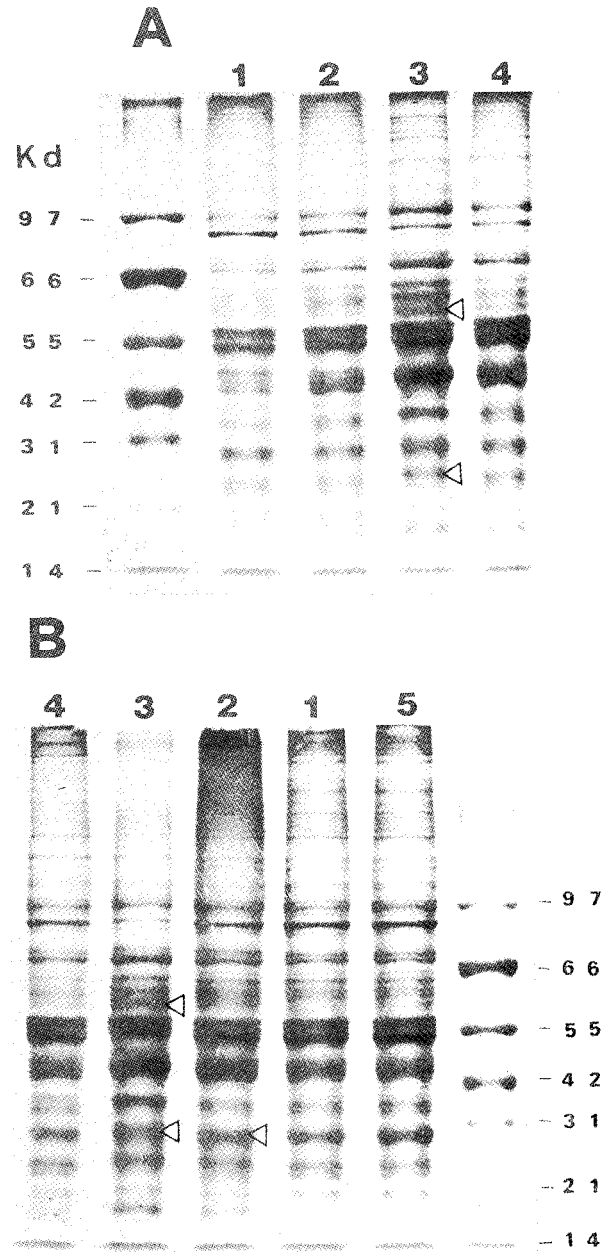


圖二、逆境對細胞內可溶性蛋白質組成的影響。從繼代培養第八天的細胞萃取可溶性蛋白質，以 SDS-PAGE(10%) 分離並以銀染呈色。每個樣品槽中加入大約 20 μg 蛋白質。 Δ 指的是增加或新的蛋白質； \uparrow 指的是減少的蛋白質。1、2、3 分別為 NaCl、缺磷、真菌抽出物等處理組 4 為對照組 5 為蛋白的標準分子量(Kd)。

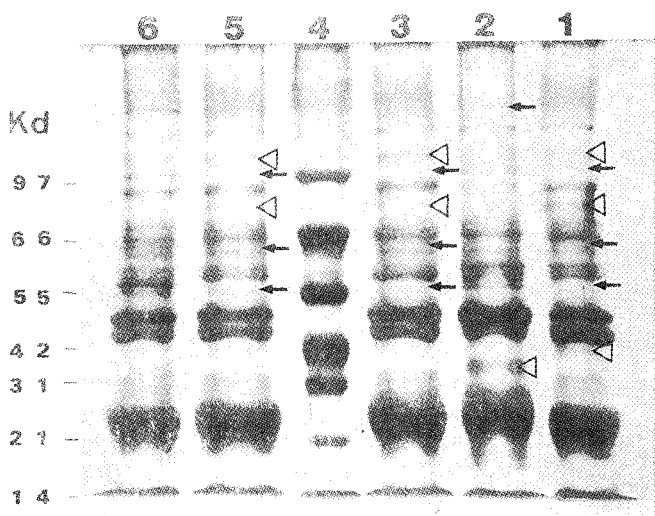
量隨著細胞的生長而增加，而處理組細胞之蛋白質含量在前三天呈現急劇的改變，可能是細胞對環境改變加以調適所致。其中細胞在缺磷環境中蛋白質含量較低，顯示缺磷條件會抑制蛋白質的合成，並導致細胞生長不良。而細胞在添加過氧化氫的處理下，並不會減低細胞內可溶性蛋白質的含量反而增加(圖一 B)。

逆境對細胞內及培養液中可溶性蛋白質組成之影響

真菌抽出物、缺磷及鹽逆境都會明顯地影響細胞內可溶性蛋白質含量下降，尤其是缺磷細胞的變化最為明顯。第八天細胞內蛋白質以 10% SDS-PAGE 電泳分離，再以銀染法呈色，結果發現這些逆境處理的細胞內蛋白質組成與未處理的細胞內蛋白質組成差異不大，只發現缺磷細胞內有 32 Kd 蛋白質含量明顯下降及 59 Kd 蛋白質含量增加，另出

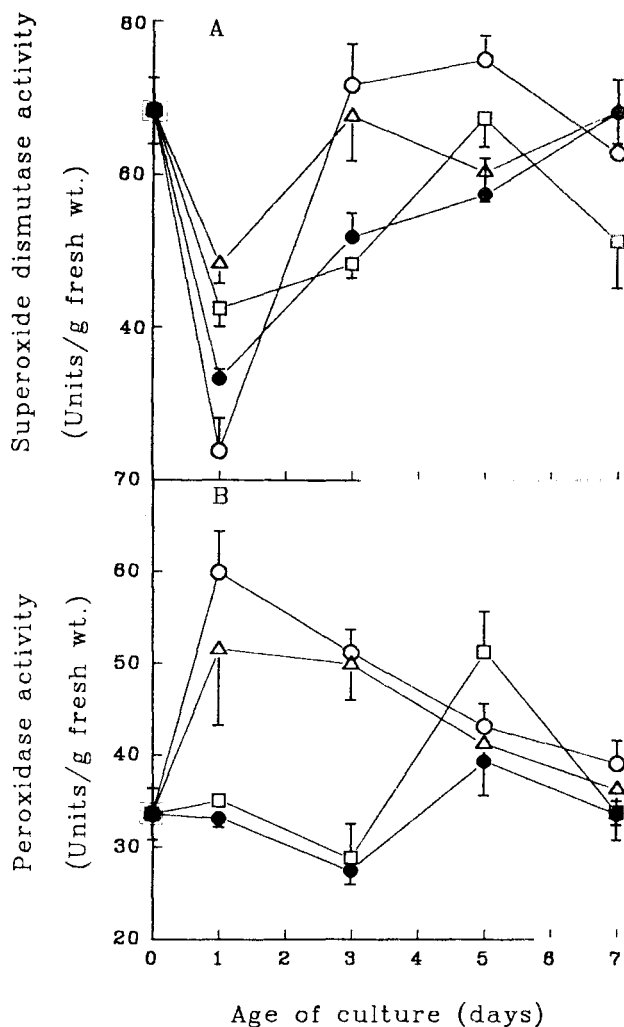


圖三、缺磷對蛋白質影響之分析。細胞分別生長在正常及缺磷培養基一週後再轉換至正常或缺磷培養基。(A) 取自轉換後第一天的細胞。1. 自正常培養基轉換至 50% 缺磷培養基 2. 自正常培養基轉換至缺磷培養基 3. 自缺磷培養基轉換至缺磷培養基 4. 自缺磷培養基轉換至正常培養基。(B) 取自轉換後第三天的細胞，1-4 與 (A) 同，5. 自正常培養基轉換至正常培養基。每個樣品槽中加入大約 30 μg 蛋白質， Δ 指的是增加或新出現的蛋白質。

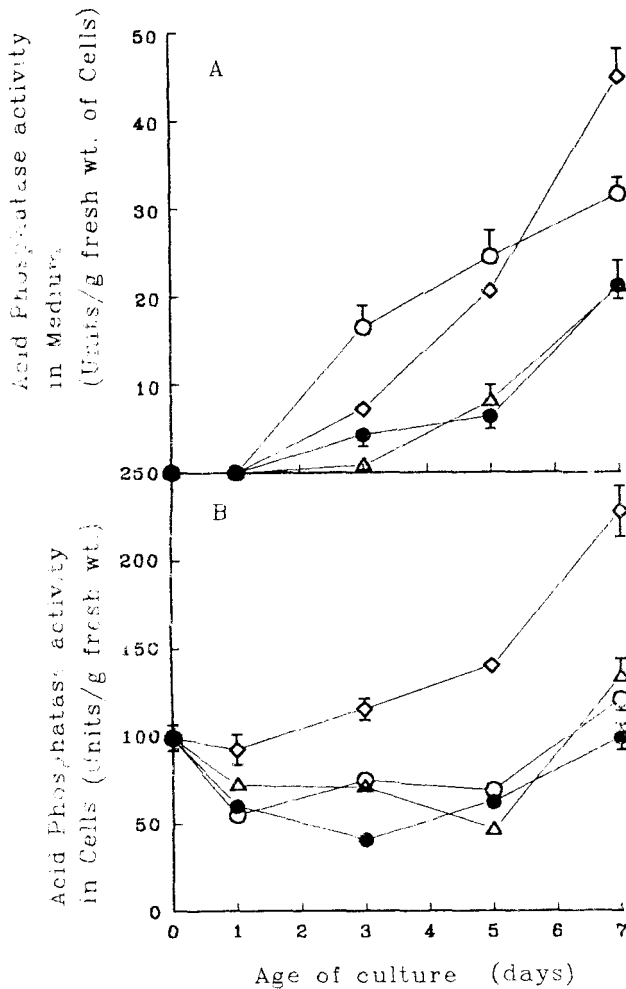


圖四、逆境對培養液中可溶性蛋白質組成的影響。蛋白質取自細胞生長第七天之培養液。經冷凍乾燥濃縮之後，將大約30 μg 蛋白質加入每個樣品槽中。 Δ 指的是增加或新的蛋白質； \uparrow 指的是減少的蛋白質。1、2、3、5分別為NaCl、缺磷、真菌抽出物、過氧化氫處理組；6. 為未處理組 4. 為蛋白的標準分子量 (Kd)。

現一種新的蛋白質帶，其分子量約為26 Kd，此蛋白質在其他逆境處理及未處理細胞中並未發現(圖二)。從培養基的轉換實驗中可發現到細胞轉換到缺磷培養基一天後，59 Kd蛋白質即明顯增高，若細胞從缺磷轉換到正常培養基三天後，此蛋白質含量仍比對照組明顯，顯示此蛋白質的合成較其分解的速度快。在細胞轉換一天後，26 Kd蛋白質祇能見於一直處於缺磷的細胞，到第三天後此蛋白質方見於從正常培養基轉換至缺磷的細胞，但並不見於轉換至含磷50%培養基或自缺磷轉換到正常培養基者(圖三)。從這些結果可以推論：一、26 Kd蛋白質為缺磷專一性誘導所產生，可稱為缺磷蛋白質26 (phosphate starvation protein, PSP26)。二、PSP26得在缺磷三天後才能明顯地觀察到。三細胞一旦轉換到正常培養基一天後，PSP26便消失，可見此蛋白質之分解相當迅速。再者若細胞自20 mM NaCl轉換到400 mM NaCl較高濃度下，細胞內有一大於97 Kd



圖五、逆境對水稻細胞內超氧歧化酶、過氧化氫酶活性之影響。A. 超氧歧化酶活性；B. 過氧化氫酶活性。(●)，MS培養基；(○)，含鹽(20 mM NaCl)之MS培養基；(□)，含過氧化氫(1.63 μM H₂O₂)之MS培養基；(Δ)，含真菌抽出物之MS培養基。



圖六、逆境對水稻酸性磷酸酶活性的影響。A. 培養基中酶的活性。B. 細胞內酶的活性。(●), MS培養基; (○), 含鹽(20 mM NaCl)之MS培養基; (Δ), 含真菌抽出物之MS培養基; (◇), 缺磷成份之MS培養基。

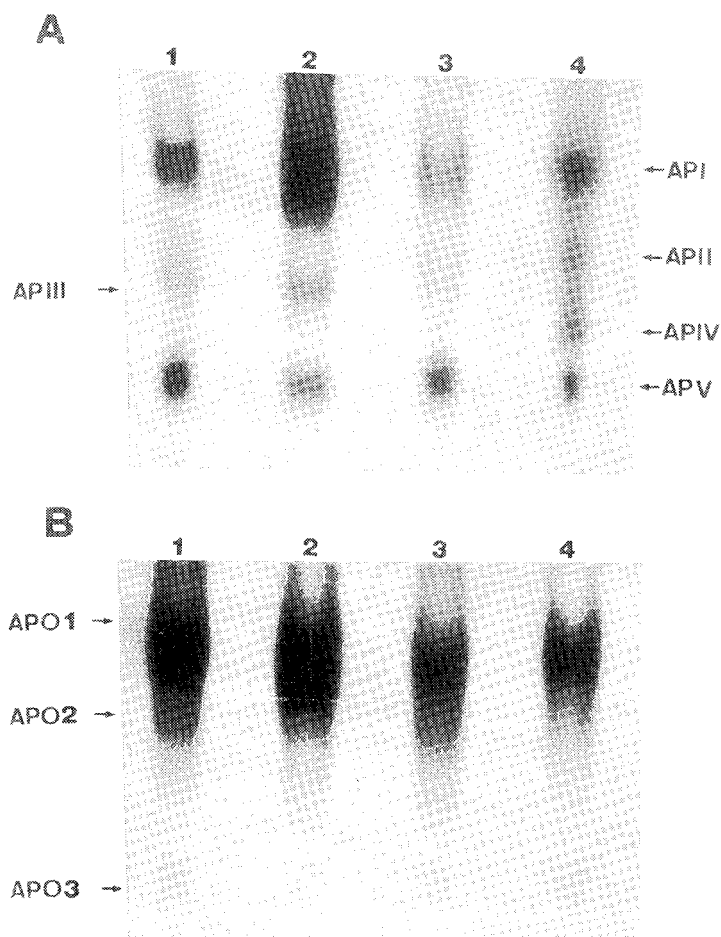
的蛋白質帶含量明顯增加，很可能與細胞對高濃度鹽逆境的適應關係密切，另 88、45 及 40 Kd 蛋白質的含量也隨著鹽濃度的增高而逐漸下降(圖未出示)。又逆境處理也都會影響培養基中某些蛋白質含量的改變，其中 97、64、55 Kd 蛋白質的含量都受到 1.63 μ M H_2O_2 、20 mM NaCl 及真菌抽出物的影響而減少；相反地 100 及 84 Kd 的蛋白質含量則出現增加的情形。含鹽培養基中發現多一條 42 Kd 蛋白質，此蛋白質在其它逆境處理及未處理細胞中都沒出現。缺磷培養基內位於約 35 Kd 的蛋白質含量則明顯增加(圖四)，顯示細胞在不良環境中其釋出的蛋白質亦會有所改變。

逆境對酶活性的影響

細胞內超氧歧化酶(Superoxide dismutase)活性對培養基的轉換特別敏感，酶活性在新鮮培養基中都會急劇下降，其中以加鹽的培養基，其酶活性降低最為顯著。此後細胞開始適應新環境，酶活性也就隨著細胞的生長而增高。加鹽處理對此酶活性有明顯的促進作用，且此高活性一直維持到第五天(圖五A)。然而從異構酶的電泳分析中，並未發現有任何新異構酶的出現，顯示酶活性的促進是因為各異構酶量增高的結果(圖未出示)。

細胞在培養過程中，過氧化氫酶(Peroxidase)活性變化並不顯著，直到第五天酶活性才稍微增高。作為酶受質之一的過氧化氫添加，也未對此酶活性有太大的影響，祇是在第五天酶活性增高時的幅度增大而已，相對地加鹽及真菌抽出物處理，則能迅速有效地誘導酶活性的增高，其中以加鹽誘導的酶活性在第一天即高達兩倍(圖五B)。過氧化氫酶為寬受質的酵素，可廣泛地參與多種代謝反應，除細胞內，細胞壁及培養基中也都可測得此酶活性。從異構酶的電泳分析中，顯示培養基中者為偏陰極向異構酶，而細胞內的異構酶則多為陽極向。然而和超氧歧化酶一樣，酶活性的促進祇是各異構酶量的增高，而未發現有新異構酶的出現。

酸性磷酸酶活性無論是細胞內或培養基中，都



圖七、酸性磷酸異構酶之電泳分析。從培養七天的細胞萃取液及其培養基，分別以7% Native PAGE電泳分離並活性染色。A.為細胞萃取液 B.為培養基濃縮液。1~3分別為NaCl、缺磷及真菌抽出物處理；4.為控制組。

在第五天後才稍有增高。真菌抽出物的處理並不影響細胞內、外酶活性的改變。加鹽處理雖然對細胞內酶活性沒有明顯的影響，但卻明顯提高培養基中此酶的活性，顯示加鹽刺激促進了酶分子的釋出。缺磷培養則更明顯促進細胞內及細胞外的酶活性，在第一天就可察覺到細胞內的酶活性增高，此後酶活性持續增強，在第五天後酶活性增強更為急劇，細胞外的酶活性增高，在時間上稍為延後，到第三天後急劇增高，顯示細胞在缺磷培養後期，急迫尋找磷源而大量生產並釋出磷酸酶(圖六)。

以電泳分析細胞內的酸性磷酸異構酶，可以觀察到五個酶帶(圖七A)，未經處理的細胞含有I、II、IV、V四酶帶，而處理組(1~3)則呈現I、III、V三酶帶，顯示細胞在逆境下II、IV異構酶不再出現，而有新的III酶帶。然而因缺磷而誘導的酶活性，主要表現於I酶帶的活性增強，再者處理細胞的V酶帶活性也顯然高於未處理細胞。培養基的異構酶有三，以APO1酶帶的表現最強(圖七B)，而處理細胞釋出到培養基的酶活性增加主要表現於APO1及APO2兩酶帶，似乎沒有新異構酶的出現。

討論

水稻懸浮細胞源自幼胚組織，細胞皆具分裂而無分化能力，因此對環境因子的刺激應有高度均質性反應，極適合作觀察細胞對刺激反應的材料。

通常細胞在正常有氧代謝情況下具有自發性的氧化反應(autooxidation)。酵素的作用、或膜上電子傳遞鏈的洩漏等途徑會導致氧分子一連串的還原作用而形成 O_2^- 、 H_2O_2 及 $\cdot OH$ 等極具破壞性的過氧化物，因此細胞內隨時有一套防禦系統(antioxidant defense system)，包括超氧歧化酶、細胞色素氧化酶及觸媒酶等，用以掃除過氧化物等有害物(Hassan and Scandalios, 1990)。這些有害过氧化物的增加可能促進細胞內超氧歧化酶、觸媒酶及過氧化氫酶等酵素活性增加，以達到自我保護的效果。過氧化氫的處理並未明顯地影響水稻細胞的超氧歧化酶及過氧化氫酶活性，唯有觸媒酶活性有明顯增高，顯然細胞主要是以觸媒酶來化解過氧化氫的堆積。繼代培養(subculture)時，轉換到新鮮培養基的細胞，其超氧歧化酶及觸媒酶的活性都急劇降低，而後再隨著細胞的生長逐漸增高，過氧化氫酶則無此現象，顯然過氧化氫酶的功能可能並不參與氧化保護作用。

當真菌感染植物細胞時，真菌細胞壁脫落的片段中，所含有的 β -glucans及幾丁質會引發植物的防

禦反應，促進抗菌物質(phytoalexins)的合成(Sharp and Albershem, 1984)。最近Yoshikawa等人(1993)也證實植物細胞的接受體和真菌抽出物的結合，能有效地刺激細胞產生防禦反應。在我們前一篇的報告中，也確定真菌抽出物能有效誘導水稻細胞增高過氧化氫酶及苯丙胺酸去胺酶的活性，二者可能直接或間接和細胞的抗菌物質合成有關(周和童，1993)。在本實驗中真菌抽出物的處理可促使過氧化氫酶及超氧歧化酶活性增高，此二酶的作用似乎不是和抗菌物質的合成直接相關，而是反映了真菌感染可能使細胞的代謝發生改變的結果。

20 mM NaCl的處理並無明顯地影響到細胞的生長，但卻能誘導多種酶活性包括超氧歧化酶、過氧化氫酶、觸媒酶及酸性磷酸酶等的增高，其中鹽處理對細胞內酸性磷酸酶活性沒有影響，但卻大量增高細胞外的酶活性。相對地，能促進細胞內過氧化氫酶活性增高，但細胞外的酶活性增高則不明顯，顯示鹽處理不但會造成細胞內代謝大幅改變，也會影響到細胞膜上的物質傳送。

缺磷處理會導致細胞內可溶性蛋白質降低，很可能因能源如 ATP、CTP、GTP、TTP等的減少，因而合成蛋白質的量降低(Ashihara *et al.*, 1988)或是胺基酸提供作為呼吸代謝的能源，而降低合成蛋白質的原料(Nagano and Ashihara, 1993)。Theodorou and Plaxton (1993) 綜合近年來各學者研究植物在缺磷逆境的適應，並提出植物的呼吸代謝途徑在缺磷逆境下會有相當彈性地改變，以避開再消耗存量已經很低的磷，並且仍然能夠維持呼吸代謝以產生有限的能量。

水稻細胞在缺磷環境下，雖然生長遲滯，蛋白質合成量降低，但卻大量提高細胞外及細胞內酸性磷酸酶的活性，這種現象反應了細胞在危急環境下的求生本能。從電泳分析可以發現細胞內59 Kd蛋白質明顯增高，並有PSP26蛋白質的出現，另一方面從酸性磷酸異構酶的電泳分析顯示細胞內酸性磷酸酶活性增高主要表現於AP I 異構酶，細胞外酸性磷酸酶活性增強也反映於APO1。從這些結果推測細胞內

59 Kd蛋白質的增高與AP I 異構酶有關，而細胞外的35 Kd蛋白質也可能和異構酶APO1相關，當然這些推測仍需進一步加以確定。而PSP26為專一性缺磷所誘導的蛋白質，非常適合作為細胞處於缺磷狀況的指標，但從蛋白質的大小以及異構酶的分析，認為此PSP26應該不是酸性磷酸酶。

參考文獻

- Ashihara, H. Li, X-N., Vekari, T. 1988. Effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of purine and pyrimidine nucleotides in suspension-cultured cells *Cattharanthus roseus*. *Anal. Bot.* 61:225-232.
- Bergmyer, H. U. 1963. Determination in serum with p-nitrophenyl phosphate. In "Methods of Enzymatic Analysis", H. U. Bergmyer, ed. pp. 783-784.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Bruegger, B. B. and N. T. Keen, 1979. Specific elicitors of glycellin accumulation in the *Pseudomonas glycinea-sobean* host-parasite system. *Physiol. Plant Pathol.* 15:43-51.
- Chance, B. and A. C. Maehly, 1955. Assay of catalase and peroxidase. In "Methods in Enzymology". S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, eds. Acad. Press, New York, pp. 764.
- Davis, B. 1964. Disc electrophoresis-2. Method and application to human serum protein. *Ann. NY. Acad. Sci.* 121: 407-427.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radical. *Science* 201:875-880.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59:309-314.
- Gove, J. P. and M. C. Hoyle, 1975. The isozymatic similarity of indole acetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. *Plant Physiol.* 56:684-687.
- Gove, J. P. and M. C. Hoyle. 1975. The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. *Plant Physiol.* 56:684-687.
- Hahlbrock, K. and D. Scheel, 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40: 347- 369.
- Hassan, H. M. and J. G. Scandalions, 1990. Stress responses in plant: Adaptation and acclimation mechanisms, pp. 175-199.

- Holland, D., G. Ben-Hayyim, Z. Faltin, L. Camoin, D. Strosbery, and Y. Fshdat, 1993. Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus : protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidase. *Plant Mol. Biol.* 21:923-927.
- Huang, A. H. C., R. N. Trelease, and T. S. Moore, 1983. Plant Peroxidase. pp. 252. Academic Press, New York and Lond.
- Kombrink, E., and K. Hahlbrock. 1986. Responses of cultured parsley cells to elicitors form phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor induced reactions. *Plant Physiol.* 81:216-221.
- Mader, M. and V. Amberg-Fisher. 1982. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. I. Oxidation of nicotinimide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidase. *Plant Physiol.* 70:1128-1131.
- Marschner, 1986. Mineral Nutrition of Higher plant. pp. 1-674. Academic Press, London.
- McCord, J. M. and I. Fridovich, 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *J. Biol. Chem.* 244:6056-6063.
- Nagano, M. and H. Ashihara, 1993. Long-term phosphate starvation and respiratory metabolism in suspension-cultured *Catharanthus rosea* cells. *Plant Cell Physiol.* 34: 1219-1228.
- Sasse, J. and S. R. Gallagher, 1992. Rapid silver staining. In "Short protocols in molecular biology", F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. eds., New York. pp. 10-30.
- Sharp, J. K. and P. Albersheim, 1984. Comparison of the structures and elicitor of a synthetic and a mycelial-wall-derived hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitol. *J. Biol. Chem.* 259 : 11341-11345.
- Shaw, J. G., 1966. Acid phosphatase from tobacco leaves. *Arch Biochem. Biophys.* 117 : 1-9.
- Somssich, E., J. Bollmann, K. Hahlbrock, Kombrink, Schulz, W. 1989. Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Mol. Biol.* 12: 227-234.
- Theodorou, M. E. and W. C. Plaxton, 1993. Metabolic adaptation of plant respiratory to nutritional phosphate deprivation, *Plant Physiol.* 101:339-344.
- Yoshikawa, M., N. Yamaoka, and Y. Takenuchi, 1993. Elicitor: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiol.* 348: 1163-1173.
- 周瑞棋和童武夫 1993. 吉貝素、細胞分裂素及真菌抽出物對水稻細胞澱粉酶之誘導。師大生物學報 28 : 65-74.

(接受日期：1995. 10. 28)

Stress Responses of Cultured Rice Cells

Mei-Hwei Tseng* and Wu-Fu Tong**

*Department of Mathematics and Science Education, Taipei Municipal Teachers College
Taipei, Taiwan 100, Republic of China

**Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan 117, Republic of China

ABSTRACT

Cell growth and physiological responses of rice suspension cells (*Oryza sativa* cv. Tainan 5) in the phosphorous deficient medium or exposed to 20 mM NaCl, 1.63 μ M Hydrogen peroxide or fungal elicitor were investigated. Cell growth and soluble protein content in cell were inhibited under the stresses. Changes of soluble protein pattern in the media and the cell extract were analyzed by SDS-PAGE. A 59 Kd protein was increased and a 26 Kd protein was induced with phosphate deficient treatment. 26 Kd protein seems to be a specific protein appeared only with phosphate deficiency. The results were further confirmed with transferred experiments. Cell growth was not obviously affected with salt treatment, while the activity increase of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in cells as well as extracellular acid phosphatase were observed. Although serious inhibition of both cell growth and protein synthesis were shown under the stress of phosphorous deficiency, activities of intra- and extracellular acid phosphatase increased with the time of stress treatment. Isozyme patterns of acid phosphatase in cells were changed with the stress treatment, but the main isozymes AP 1 and APO1 should be responsible for the activity increase. The results indicate that stress could affect the cells to terminate some proteins to be synthesized and to synthesize certain new proteins simultaneously. For adaptation to the stressful environment cells should inevitably adjust the metabolism of itself in order to survive.

Keywords: rice cells, stress, enzyme induction