

不同分化状态的白百利烟草愈伤组织 在生长过程中核酸蛋白质的变化*

张克荣 孙 涛 李玉民 吕美薇 倪德祥 孙鸿乔

(复旦大学生命科学院, 上海 200433)

提 要 本文报道了在正常分化芽和根、诱导芽或根定向发生的白百利烟草 (*Nicotiana tabacum* Baibaili) 愈伤组织在生长过程中DNA、RNA和蛋白质变化的结果。MS+0.2mg/l NAA+0.2mg/l KT 诱导白百利烟草愈伤组织正常分化出芽和根, MS+0.05mg/l NAA+2mg/l KT 诱导愈伤组织定向地芽发生, MS+0.5mg/l NAA+0.05mg/l KT 诱导愈伤组织定向地根发生。在定向诱导芽或根发生愈伤组织里的RNA和蛋白质合成的第一个高峰出现, 比正常发生芽和根的愈伤组织里DNA、RNA和蛋白质的第一个高峰迟5天, 在芽发生的愈伤组织里DNA峰出现也迟5天, 在根发生的愈伤组织里DNA峰, 则相同于正常分化的愈伤组织DNA峰出现。外源的植物生长物质诱导器官定向发生的作用表现在RNA水平上。在三种分化状态的愈伤组织里, 蛋白质组成在第8天表现出明显的差异。41KD和46KD蛋白质在器官的定向发生中可能起着相当重要的作用。

关键词 愈伤组织; 分化; 生长; DNA; RNA; 蛋白质

高等植物的细胞和愈伤组织的分化, 是一个极其复杂的过程, 有很多因素在起作用, 其中包含着许多生物物质的变化^[1]。Raghavan^[11]研究了在胚胎发育过程中核酸的变化。朱治平等^[2]对水稻胚发育过程中核酸和蛋白质的变化, 进行了系统的研究。Fujimura等^[6]发现在球状胚形成之前和期间, DNA合成很活跃, RNA和蛋白质含量稳定上升。在分化状态与蛋白质种类的研究方面, Sekiya等^[12]报道了在形成分化状态的愈伤组织里, 形成某些特殊的蛋白质。Liang-Jwu Chen^[9]比较了有胚愈伤组织和无胚愈伤组织蛋白质的差异。Zee等^[13]以芹菜叶柄为外植体, 研究其在脱分化和分化过程中蛋白质的差异。黄大年等^[8]研究了继代培养中玉米花粉愈伤组织无性系的核酸和蛋白质的变化, 发现在具有分化能力的品系中含有特殊的蛋白质分子。因此, 植物的细胞和愈伤组织分化生长过程DNA、RNA和蛋白质的研究, 是发育生物学研究的一个极其重要的领域。但是至今, 未见到系统地研究同一种植物的细胞或愈伤组织, 在不同分化状态的生长过程中DNA、RNA和蛋白质变化的报道。本文报道了在仅分化芽或仅分化根并同时分化芽根的白百利烟草愈伤组织, 在生长过程中DNA、RNA和蛋白质变化的研究结果。

本文于1988年9月17日收到。

* 本项研究工作得到复旦大学自然科学青年资金的资助。

材料与方 法

1. 白百利烟草愈伤组织的培养和定向分化器官的诱导

不同分化状态愈伤组织核酸、蛋白质分析测定的愈伤组织培养按前文^[4]所述的方法进行。正式的3次实验所用材料力求完全一致。

用三叶期的白百利烟草叶片为外植体,经过在培养基为MS+0.2mg/l NAA+0.2mg/l BA的诱导培养,得到愈伤组织。取新培养的愈伤组织,愈伤组织培养的时间、大小和色泽完全一致,转接到没有任何外源植物生长物质的MS培养基中继续培养4天,然后再分别接种到诱导芽发生的培养基(MS+0.05mg/l NAA+2mg/l KT),诱导根发生的培养基(MS+0.5mg/l NAA+0.05mg/l KT)和诱导芽根同时发生的培养基(MS+0.2mg/l NAA+0.2mg/l KT)中培养。在诱导3种分化状态的愈伤组织,生长到一定时间时(0、4、9、12、15、18天),分别各称取1克鲜重,立即放到-20℃冰箱中贮存。待分析测定其核酸和蛋白质的含量。

正式3次实验所用的愈伤组织都在25±1℃,光照为1500lx,每天定时辅助10小时光照下培养。

2. 不同分化状态的愈伤组织中核酸和蛋白质的抽提、分离和测定

正式实验中所取的各种材料都放在-20℃低温冰箱中贮存,然后统一进行核酸和蛋白质的抽提、分离和测定。采用朱治平等^[2]的方法抽提、分离DNA、RNA和蛋白质,以及RNA的测定。DNA的测定采用朱俭等^[1]的方法,蛋白质的测定采用Lowry^[10]的方法。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析不同分化状态愈伤组织的可溶性蛋白

(1) 分别取在不同分化培养基中培养4、8天的愈伤组织各1克,加入0.25ml样品抽提液(样品抽提液由62.5mmol Tris-HCl, pH=6.5, 1mmol苯甲基磺酰氟(PMSF) 10%甘油组成),匀浆,匀浆液在台式高速离心机以10000r·p·m离心15分钟,上清液加入SDS和β-巯基乙醇,并使最终浓度分别为2%(W/V)和5%(V/V),在沸水中加热5分钟,此为电泳样品。

(2) SDS-PAGE电泳和电泳图谱的扫描:

电泳方法参考生化大实验教程^[3],其中浓缩胶(4%)10ml中, 30% Acr—0.8% Bis 1.34ml, 1.5mol Tris-HCl (pH=6.8) 8.36ml, 5% Asp 0.3ml, TEMED 30μl; 分离胶(10%)15ml中, 30% Acr—0.8% Bis 5.025ml, 1.5mol Tris-HCl (pH=8.8) 9.60ml, 5% Asp 0.375ml, TEMED 15μl。

以30mA/板稳流,在4℃下电泳约4小时,在染色液(染色液由0.25%考马斯亮兰R-250, 45%甲醇, 1%乙酸组成)中染色2小时,在脱色液(脱色液由5%甲醇, 7%乙酸组成)。蛋白电泳谱在Shimadzu Dual-Wavelength TLC Scanner CS-910上,在595—720nm范围内扫描。

结 果 与 讨 论

1. 外源植物生长调节物质诱导白百利烟草愈伤组织定向分化芽或根

在不含任何外源植物生长调节物质的MS培养基上,培养4天的白百利烟草愈伤组织,接种到诱导芽或根定向分化的培养基上,经过10天左右的培养,愈伤组织分化出大

量的芽原基或根原基, 在这两种诱导分化的培养基上继续培养到20—25天, 就明显地长出芽或根, 见图1和图2。



图1 具有大量芽发生的白百利烟草愈伤组织
Fig.1 *Nicotiana tabacum* callus with bud organogenesis



图2 具有大量根发生的白百利烟草愈伤组织
Fig.2 *Nicotiana tabacum* callus with root organogenesis

2. 不同分化状态的白百利烟草愈伤组织在生长过程中DNA、RNA和蛋白质的变化

表1 不同分化状态的白百利烟草愈伤组织在生长过程中DNA、RNA和蛋白质的含量

Table 1 The levels of DNA, RNA and protein during growth of *Nicotiana tabacum* callus with different differentiation

培养基成分	分化状态	培养时间 (天)	核酸含量(mg/g鲜重)			蛋白质含量
Composition of culture medium	State of callus differen- tiation	Culture time (day)	Content of nucleic acid (mg (gFW) ⁻¹)			(mg/g鲜重) protein (mg(gFW) ⁻¹)
			DNA	RNA	总核酸 (NA)	
MSO	不分化 No-differ- entiation	0	0.297±0.032	1.031±0.074	1.328±0.106	23.62±0.80
MSO+NAA0.5 mg/l+KT0.05 mg/l	分化根	4	0.442±0.043	0.713±0.062	1.155±0.105	17.62±0.74
	Differen- tiation with root	9	0.342±0.037	3.670±0.087	4.012±0.124	15.11±0.72
		12	0.275±0.025	1.583±0.057	1.858±0.082	16.14±0.77
		15	0.344±0.030	1.362±0.089	1.706±0.119	23.88±0.81
		18	0.244±0.035	0.603±0.063	0.847±0.098	11.84±0.72
MSO+NAA0.05 mg/l+KT2mg/l	分化芽	4	0.276±0.035	0.804±0.067	1.080±0.102	29.81±0.79
	Differen- tiation with bud	9	0.502±0.040	2.547±0.084	3.049±0.124	15.02±0.74
		12	0.220±0.038	0.696±0.061	0.916±0.099	17.33±0.66
		15	0.192±0.037	2.115±0.082	2.307±0.119	34.82±0.82
		18	0.254±0.032	3.001±0.093	3.225±0.125	32.71±0.79
MSO+NAA0.2 mg/l+KT0.2 mg/l	分化芽和根	4	0.442±0.041	2.047±0.084	2.489±0.125	16.21±0.74
	differen- tiation with both bud and root	9	0.303±0.040	1.608±0.077	1.911±0.117	8.12±0.67
		12	0.249±0.027	1.219±0.087	1.468±0.114	21.46±0.73
		15	0.275±0.037	1.308±0.074	1.583±0.111	10.47±0.57
		18	0.230±0.028	1.054±0.072	1.284±0.100	29.82±0.79

表中的数据是3次实验的平均值±标准误差, 即数据的95%置信区间= $\bar{x} \pm (S\bar{x}) \times t(95\%)$ 。

Number in the table showing the mean±standard error in 3 experiments

取在诱导分化芽或根和同时分化芽和根的培养基中,培养一定时间的愈伤组织各1克,按材料和方法中所述的方法,测定DNA、RNA和蛋白质含量的变化,每次实验有3个重复,3次的正式实验结果如表1所示。

根据表1的数据,得到了图3—5所示的分化芽、分化根和同时分化芽根的愈伤组织,在生长过程中DNA、RNA总核酸和蛋白质变化的时间进程曲线。

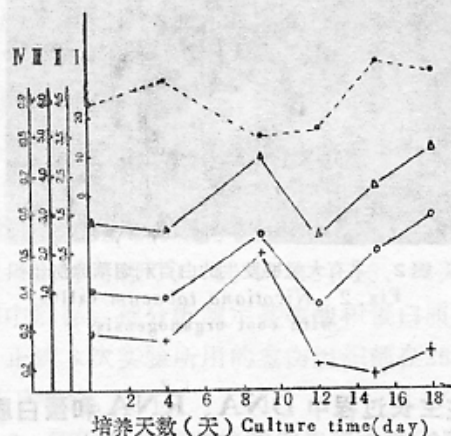


图3 Fig. 3

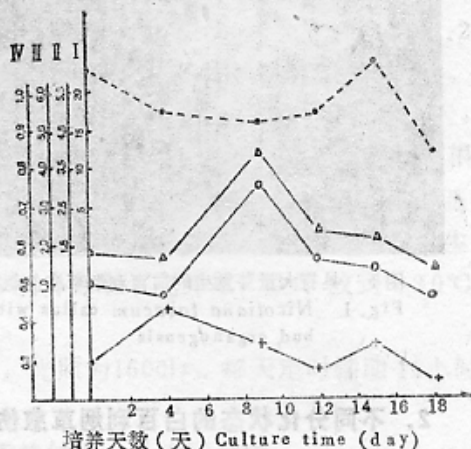


图4 Fig. 4

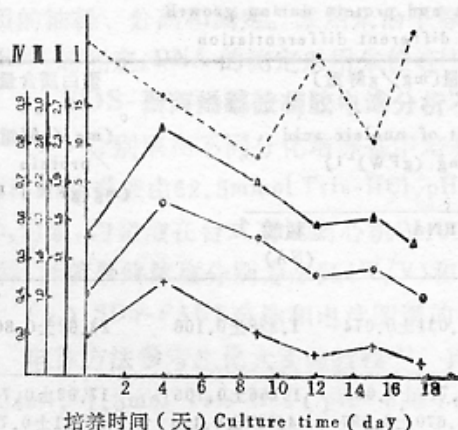


图5 Fig. 5

图3—5 分化芽,分化根和同时分化芽根的白百利烟草愈伤组织在生长过程中DNA、RNA和蛋白质的时间进程曲线

Fig. 3—5 Time-course curves of DNA, RNA and Protein during growth of *Nicotiana tabacum* callus with bud, root and both bud and root differentiation respectively

- I. --- · mg蛋白质(protein)/g鲜重(FW)
 II. △——△mg总核酸(NA)/g鲜重(FW)
 III. ○——○mg RNA/g鲜重(FW)
 IV. +——+mg DNA/g鲜重(FW)

由表1和图3—5可见,在MS培养基上培养的白百利烟草愈伤组织,转移到分化芽、根的培养基($MS + 0.2mg/l$ NAA + $0.2mg/l$ KT)上培养4天,就出现了DNA、RNA含量高峰,在距核酸高峰8天,出现了第一个蛋白质高峰。在仅分化芽的培养基($MS + 0.05mg/l$ NAA + $2mg/l$ KT)上,培养的白百利烟草愈伤组织里的DNA、RNA,在第8天才出现第一个高峰,蛋白质的高峰与核酸的高峰相距7天。在仅分化根的培养基($MS + 0.5mg/l$ NAA + $0.05mg/l$ KT)上,培养的白百利烟草愈伤组织DNA,在第4天出现第一个高峰,而RNA和总核酸的第一个高峰在第8天才出现,蛋白质的高峰与核酸的高峰也相距7天。在通过高或低的NAA/KT的值来诱导芽或根特定器官的分化,其RNA和蛋白质的高峰都比正常分化芽根的愈伤组织推迟4—5天。蛋白质的第一个高峰

无论在正常分化芽和根的愈伤组织, 还是在诱导特定器官根或芽发生的愈伤组织里, 都是在 RNA 高峰出现 6—8 天后才出现。

在图 5 所示的正常分化芽根的愈伤组织里, 在前 4 天, DNA、RNA 和总核酸的含量都有明显上升, 在 5—8 天又表现出明显的下降, 在核酸下降到 9—15 天期间, 合成的蛋白质含量显著地上升和下降。在前 15 天中, 核酸和蛋白质的含量变化很大, 说明了在这段时间, 基因转录、转译和蛋白质的合成代谢非常活跃, 为形态建成制造了大量的物质。此后, 核酸的水平变化起伏不大, 而蛋白质的水平变化起伏仍然很大, 推测植物在形态建成中, 包含着新的蛋白质合成和对无用的蛋白质解体, 解体的蛋白质的基本“零件”又可能重新用于合成新的蛋白质。这些变化类似于水稻胚发育过程中的 DNA、RNA 和蛋白质的变化^[2]。

在图 3—4 中, 在诱导仅分化芽的愈伤组织里, 在前 4 天 DNA、RNA 和蛋白质水平没有表现出明显的上升和下降; 在诱导根分化的愈伤组织的前 4 天, RNA 和蛋白质的水平也没有表现出显著的上升和下降。推测在这 4 天中, 由于高或低的 NAA/KT 值, 可能通过“胁迫”作用, 强迫愈伤组织内源植物激素的水平进行调整, 并表现出 DNA、RNA 和蛋白质合成代谢的“滞缓期”; 在内源激素水平调整后, DNA、RNA 和蛋白质的合成开始表现出明显的起伏变化, 这些变化类同于在正常分化芽根愈伤组织里的变化。我们在白百利烟草愈伤组织的形态建成中, 外源的植物生长调节物质与内源植物激素的相关性研究中, 支持这种推测, 得到诱导器官发生的培养基里, 外源植物生长调节物质生长素类/细胞分裂素类值, 与内源的 IAA/细胞分裂素的值呈负相关的结果, 并且认为外源的植物生长调节物质在愈伤组织的器官发生中, 仅起诱导作用或称为“胁迫”作用, 而愈伤组织中内源植物激素的水平, 并且主要是生长素/细胞分裂素的值, 在器官的发生中起调控作用(具体结果见上海农业学报 1989 年第 1 期)。

由图 3 可见, 外源植物生长物质诱导芽发生, 似乎表现在 DNA 和 RNA 变化上, 而在图 4 诱导根器官发生, DNA 的含量变化与正常分化芽根愈伤组织里的变化相似, 但是, RNA 的高峰仍然在第 8 天才出现。可见, 外源植物生长物质诱导特定器官的分化, 主要表现在 RNA 水平上。但实质上是由内源激素的水调控基因表达的结果。例如, 在运用 DNA 探针的技术, 证明了 α -淀粉酶 mRNA 量的增加与 GA_3 的增长呈正相关, 而这种增加受 ABA 抑制, 提供了 GA_3 和 ABA 在 α -淀粉酶的基因转录水平上起调控作用^[8]。运用体内 RNA 标记和合成抑制剂等技术, 得到在小麦胚的成熟过程中 Ts 谷球蛋白受 ABA 调控, 而且是在转录水平上的调控^[7]。我们的结果证明了, 外源植物生长调节物质的诱导作用表现在 RNA 上。当然, 实质上是外源植物生长调节物质引起内源激素水平的变化, 内源植物激素的水平使 RNA, 可能主要是 mRNA 水平变化。继之, 又表现出蛋白质的种类和水平的变化。

SDS-PAGE 比较分析了 3 种分化状态的白百利烟草愈伤组织生长第 4 天, 第 8 天时可溶性蛋白质的差异, 结果如图 6—7 所示。

由图 6 可见, 在生长 4 天的 3 种分化状态的白百利烟草愈伤组织, 它们的可溶性蛋白组成没有表现出明显差异。但是, 在生长的第 8 天(图 7 所示), 在诱导定向器官根或芽发生的愈伤组织 RNA 出现高峰时, 可溶性蛋白的组成表现出明显的变化。在诱导愈伤组织定向分化出芽或根发生的愈伤组织的可溶性蛋白, 分别出现 46KD、41KD 和 41KD 的

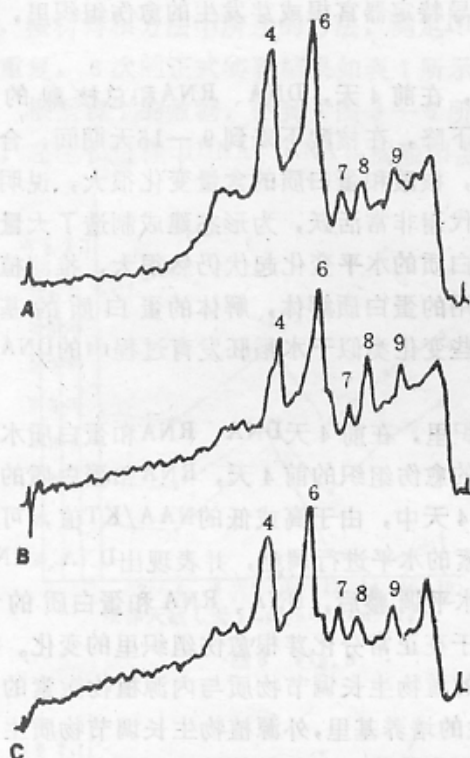


图6 生长4天的不同分化状态的白百利烟草愈伤组织可溶性蛋白电泳扫描图谱

在图6-7中: A, A': 分化芽的愈伤组织; B, B': 分化芽和根的愈伤组织; C, C': 分化根的愈伤组织。1(46KD), 2(41KD), 3(35KD), 4(34KD), 5(33KD), 6(32KD), 7(21.5KD), 8(19KD), 9(15.4KD)。

Fig. 6 Scanning of soluble protein band of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for *Nicotiana tabacum* callus with different differentiation for 4 days

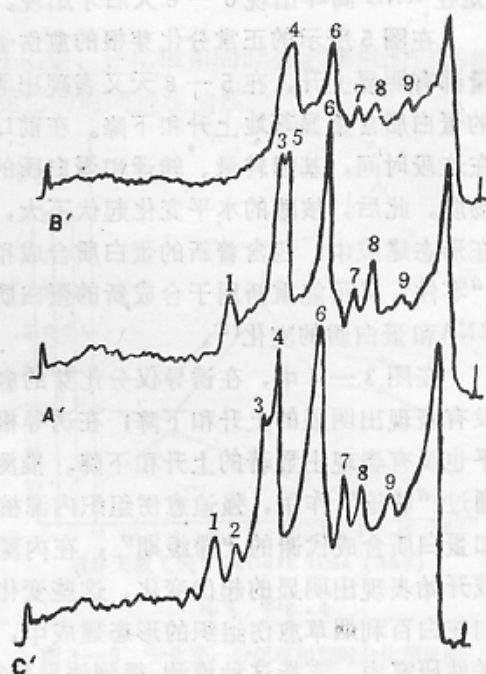


图7 生长8天的不同分化状态的白百利烟草愈伤组织可溶性蛋白电泳扫描图谱

在图6-7中: A, A': 分化芽的愈伤组织; B, B': 分化芽和根的愈伤组织; C, C': 分化根的愈伤组织。1(46KD), 2(41KD), 3(35KD), 4(34KD), 5(33KD), 6(32KD), 7(21.5KD), 8(19KD), 9(15.4KD)。

Fig. 7 Scanning of soluble protein band of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for *Nicotiana tabacum* callus with different differentiation for 8 days

Fig 6-7 A, A': The callus with bud differentiation; B, B': The callus with both bud and root differentiation; C, C': The callus with root differentiation. 1(46KD), 2(41KD), 3(35KD), 4(34KD), 5(33KD), 6(32KD), 7(21.5KD), 8(19KD), 9(15.4KD)

蛋白组分, 推测41KD和46KD蛋白质在定向器官发生中起着相当重要的作用, 可能起着“调控”的作用。在诱导芽发生的愈伤组织里, 33KD蛋白消失, 出现32KD和34KD两条蛋白带。在诱导根发生的愈伤组织里, 出现了35KD蛋白质带, 这些变化可能与这些蛋白质的功能变化有关。在低分子量区域的3条蛋白质仅表现出量的消涨, 没有出现新组分的蛋白质, 这种蛋白质在量上的消涨起何种作用, 现在还不清楚, 还有待于进一步研究。

本文中缩写:

BA: 6-苄基腺嘌呤; NAA: 萘乙酸; KT: 细胞激动素; MS: MS培养基; Acr: 丙烯酰胺; Bis: 甲叉双丙烯酰胺; TEMED: N, N, N', N'-四甲基乙二胺; Asp: 过硫酸铵

参 考 文 献

- 1 朱 俭等. 生物化学实验, 上海科技出版社, 1981: 124—127
- 2 朱治平等. 植物生理学报, 1980; 6: 141—147
- 3 李玉民等. 生物化学实验技术教程, 复旦大学出版社, 1983: 1—19
- 4 张克荣等. 自然杂志, 1988; 11: 75—76; 845—850
- 5 黄大年等. 遗传学报, 1987; 14: 114—120
- 6 Fujimura T et al. *Physiol Plant*, 1980; 49: 255—260
- 7 John D Williamson, Ralph S. Quatrano. *Plant Physiol*, 1988; 86: 208—215
- 8 Jacobsen J V, Beach L R. *Nature*, 1988; 316: 275—277
- 9 Liang-Jwu (Chen) et al. *Plant Science*, 1987; 18: 181—188
- 10 Lowry O H. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265—275
- 11 Raghavan V. *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*, 1976: 52—70
- 12 Sekiya J et al. *Bull Inss Chem Kuoto Univ*, 1973; 52: 246—255
- 13 Zee S Y, Wu S C, Yue S B. *Z Pflanzenphysiol.*, 1979; 95S: 397—403

THE CHANGE OF NUCLEIC ACID AND PROTEIN DURING GROWTH OF NICOTIANA TABACUM BAIBAILI CALLUS WITH DIFFERENT DIFFERENTIATION

Zhang Kerong, Sun Tao, Lu Meiwei, Li Yumin,
Ni Dexiang, Sun Hongqiao

(School of life sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract This paper studied the change of DNA, RNA and protein during growth of callus of Baibaili tobacco (*Nicotiana tabacum* Baibaili) with bud, root and both bud and root differentiation respectively. The culture media containing MS+NAA 0.2 mg/l+KT 0.2 mg/l, MS+NAA 0.05 mg/l+KT 2 mg/l and MS+NAA 0.5 mg/l+KT 0.05 mg/l respectively induced Baibaili tobacco callus to be both bud and root, bud, and root organogenesis. The peaks of DNA, RNA and protein in callus with bud differentiation and the peaks of RNA and protein in root differentiation were five days later than the peaks of DNA, RNA and protein in callus with both bud and root. The peak of DNA in callus with root differentiation was the same as in callus with both bud and root differentiation. It seems that the influence of exogenous growth regulators inducing orientation organogenesis is on RNA. There was notable difference in the compositions of soluble protein of callus with bud, root and both bud and root differentiation. It also seems that 41 KD and 46 KD proteins might have important actions in orientation organogenesis.

Key words Callus; Differentiation; Growth; DNA; RNA; Protein