

继代培养中水稻愈伤组织核酸、 蛋白质以及酶的动态变化

朴钟泽

(天津市农业科学院农作物研究所, 天津, 300112)

摘 要

水稻愈伤组织在继代培养过程中产生分化能力不同的无性系, 在分化培养基上的分析结果表明, 具有分化能力的无性系DNA、RNA、蛋白质含量明显高于丧失分化能力的无性系; DNase、RNase活性也有差异, 但不明显; RNA、碱基组分中嘧啶/嘌呤值存在明显差异。这些生化代谢上的差异在组织分化盛期表现最显著。有分化能力的无性系在分化过程中, 产生与组织分化有关的蛋白质谱带和过氧化物酶同工酶带, 淀粉酶同工酶带与组织分化关系不明显。

关键词 愈伤组织 分化能力 DNA RNA 蛋白质 同工酶

在组织培养的早期研究中发现, 经长期继代培养的愈伤组织逐渐丧失再生植株的能力, 这是在植物组织培养过程中普遍存在的一种障碍。

最初有人认为, 再分化能力的丧失与培养过程中染色体倍性的变化有密切关系^[5]。后来非整倍性的烟草愈伤组织再生植株的培育成功, 证实了倍性变化并不影响再分化能力, 而可能与其它内源物质有关。

本试验是基于上述的研究结果, 进一步探讨不同分化能力的水稻胚愈伤组织在分化培养基上的生化代谢变化, 以求探明影响分化能力的内在生理原因。

材料和方法

供试材料取自水稻品种台北309的胚性愈伤组织, 经长期继代后, 根据外观形态区别不同分化能力的愈伤组织。具有分化能力的无性系(简称A系), 外观紧凑, 浅白色; 丧失分化能力的无性系(简称B系), 外观松散、浅褐色。将大小一致、分化能力不同的新鲜愈伤组织分别接种于分化培养基上, 每隔2天取样测定一次, 每一样品测2次, 取其平均值, 2次重复。

1. DNA、RNA含量测定

参照《植物生理学实验手册》^[2]提供的方法。

2. RNA降解产物分析

参照黄大年等的方法〔1〕,用高效液相色谱仪LC-3A型测得。

3. 蛋白质含量、DNase、RNase活性测定

准确称取1.000克愈伤组织与5毫升0.02M磷酸缓冲液(pH 7)和少量石英砂一起充分研碎,在4℃下严格操作。在0℃下将研磨物经10000rpm离心25分钟,上清液即是标准酶制品。按Lowry等的方法求出蛋白质含量〔9〕。

4. 过氧化物酶同工酶、淀粉酶同工酶以及水溶性蛋白质电泳

取标准酶制品0.5毫升加40%蔗糖0.5毫升作为样品,在5~10℃下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,具体方法参照《植物生理生化实验》〔3〕。

结果与分析

一、DNA、RNA含量变化

化

在分化培养基上,无性系A系和B系的DNA含量存在很大的差异。如图1a所示,在整个培养过程中A系的DNA含量都很高,明显超过了B系。不同培养时期DNA含量变化曲线也明显不同,从培养的第4天开始A系DNA含量急剧上升,第6天达到了最大值,而后缓慢下降。B系在培养的前期,DNA长时间维持在低含量的水平上,而且较稳定,从第8天开始上升,第11天达到最大值,但仅与A系低限含量水平相近,此后又开始逐渐下降。

在分化培养基上,不同分化能力的无性系RNA含量也表现不同(图1b)。

A系转接后RNA含量上升较快,第8天达到最大值,其后开始有所下降,至11天后又再次上升。B系转接后RNA含量平缓上升,至第11天达到最大值,后又急剧下降,到第14天时低于初始水平。由图1中可以明显看出,A系的DNA、RNA合成水平大大高于B系,并且DNA合成高峰早于RNA。

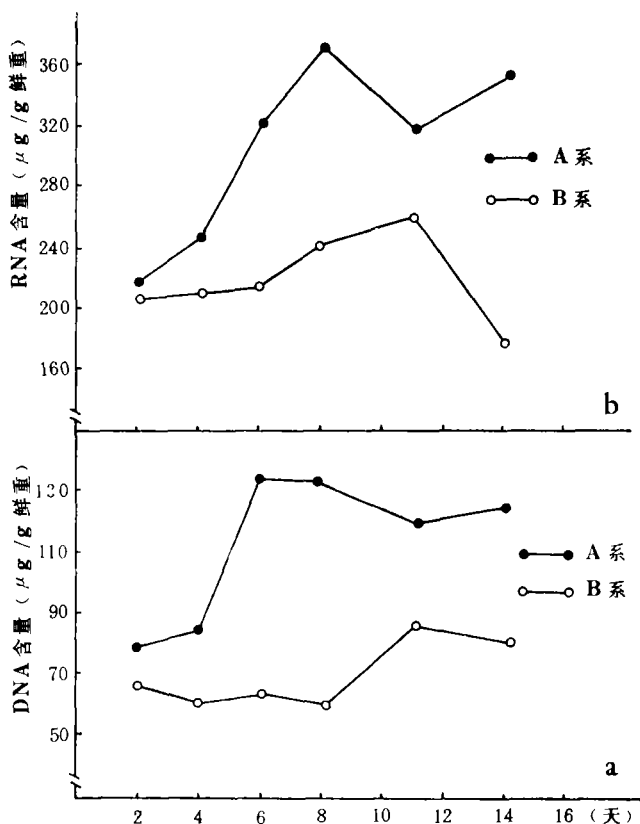


图1 无性系A系和B系的DNA、RNA含量变化

二、DNase、RNase活性变化

从图2中可见, 无性系B系二种核酸酶活性呈现骤升—骤降—骤升的剧烈变化曲线; 无性系A系除DNase活性在第8~11天有急骤下降过程外, 核酸酶活性曲线相对比较平稳, 没有第二次骤升的情况。培养前期A系的核酸酶活性上升较快, 平均值大于B系, 尤以第8天差距最大; 培养后期由于B系的酶活性又一次急骤上升, 至培养第10天后核酸酶活性绝对最高值明显高于A系。

DNase、RNase 是参与核酸代谢的重要酶类之一, 在植物体内能降解DNA和RNA, 而所产生的降解产物又为合成新的核酸提供了原料。因此, 核酸酶具有合成和降解核酸的双重作用。不仅如此, 它们还参与转录产物的加工、修饰、分解, 从而影响翻译产物的表达。又从图1、2中不难看出, 不同分化能力的无性系在核酸的合成代谢和分解代谢上存在差异, 尤其培养的第4~10天差异更显著。这说明, 组织分化过程中需要合成新的核酸以及提供丰富的合成核酸所需原料。另外, 分化培养基中细胞分裂素之类的物质, 对提高核酸酶活性, 加速核酸分解也有一定的作用。

三、RNA碱基组分中嘧啶/嘌呤比值变化

上述试验结果表明, 分化能力不同的愈伤组织间核酸含量有明显的差异。为进一步了解这种差异的内在原因, 我们对RNA碱基组分进行了分析。如图3所示, 不同分化能力的无性系嘧啶/嘌呤的比值及其变化情况是不相同的, 说明两种类型的无性系RNA种类有差异。在分化培养基上A系的嘧啶/嘌呤随培养日数的增加而增大, 培养到第6天达到最大值, 然后下降, 而B系培养的前4天和第8天以后嘧啶/嘌呤的变化趋势与A系基本相一致, 而在第6天前后降到低谷, 以A系之间的差异明显加大。RNA碱基组分的不同, 表明RNA种类是不

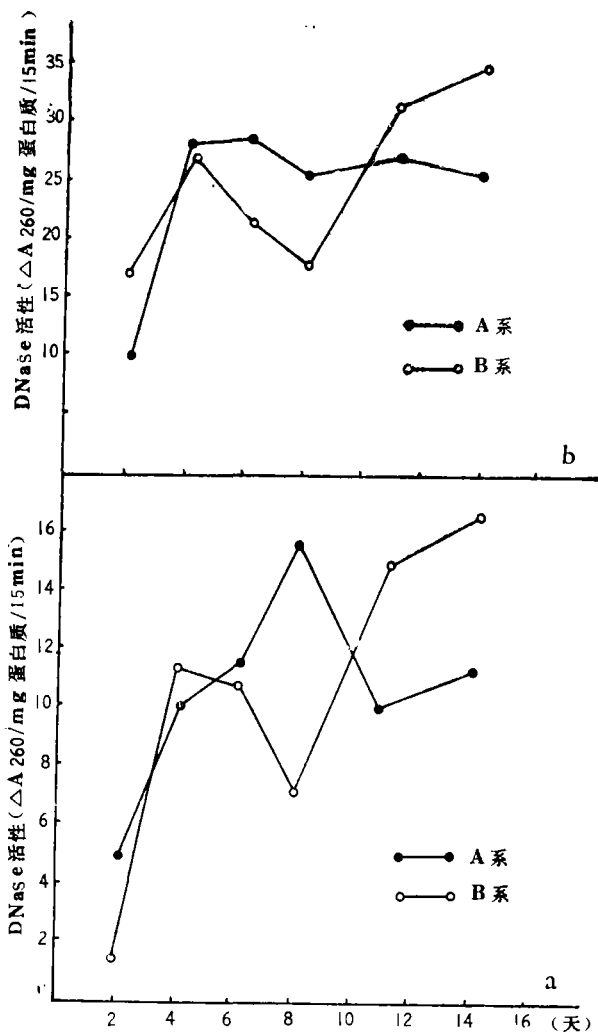


图2 无性系A系和B系的DNase、RNase活性变化

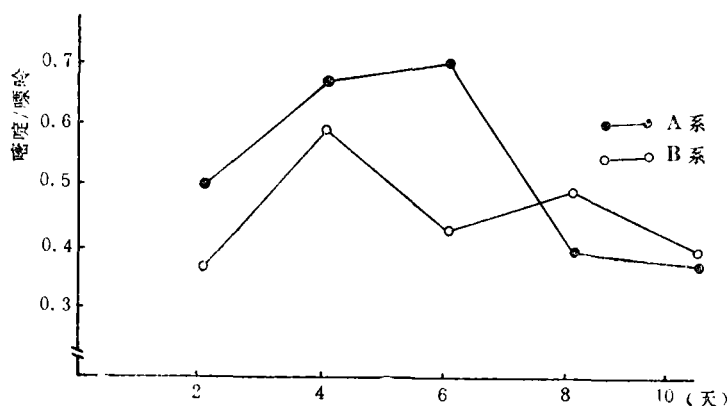


图3 无性系A系和B系的嘧啶/嘌呤比值变化

一样的。分化培养6天左右正是RNA代谢最旺盛时期，此时增加的RNA多属新的种类，而且是受分化基因调控产生的。也可以说，在分化组织中出现了与分化有关的新的遗传信息。

四、蛋白质含量及蛋白质谱带的变化

图4所示，A系在分化培养基上随培养日数的增加蛋白质含量也逐渐增加，培养到第11天达到最大值，后又逐渐下降。B系蛋白质含量从培养初期呈下降趋势，第6天后开始上升，培养到第8天达到最大值，后又逐渐下降。在前8天的培养过程中，尽管两者蛋白质含量的变化趋势不一致，但含量水平没有明显差异。而培养第8天后，A系的蛋白质含量继续增高，而B系不断下降，两种无性系的蛋白质含量出现明显差异。坂齐等（1974）研究报告〔7〕，水稻愈伤组织培养到第6天器官开始分化，第10~14天达到了最高峰。这恰好说明，不同分化能力的无性系在器官分化的活跃时期，蛋白质代谢有很大的差异。

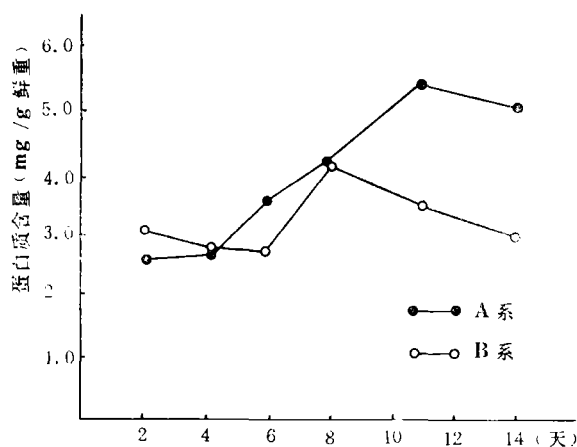


图4 无性系A系和B系的蛋白质含量变化

为进一步了解无性系所含蛋白质组成情况，我们把分化培养11天的无性系蛋白质粗提取液进行了凝胶电泳分析。结果表明，A系和B系的蛋白质电泳扫描图形状基本相似，说明，在其蛋白质组成中，大部分蛋白质种类是相同的。但也出现了彼此不同的蛋白质谱带，如图5中n箭头所表示的就是A系新形成的蛋白质谱带，它可能是与组织分化有关的蛋白质，而B系中未曾出现。可以说明，蛋白质含量的增加与出现新蛋白质也有关。

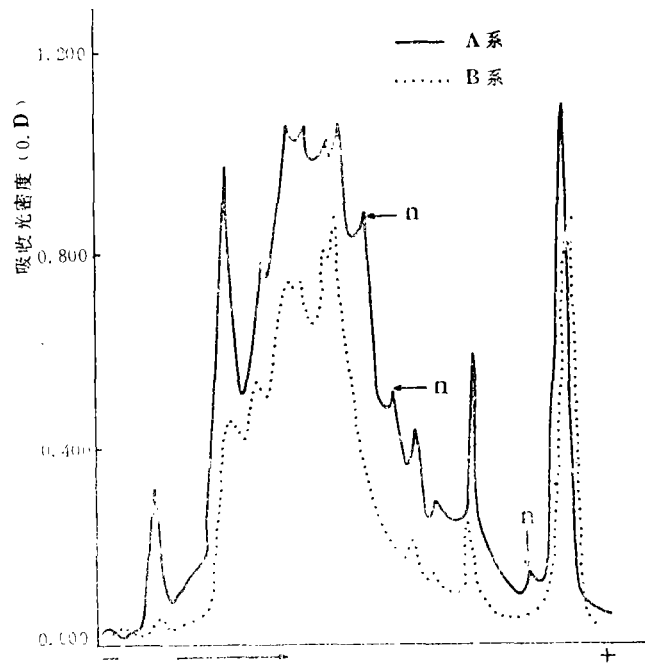


图5 无性系A系和B系粗蛋白提取液凝胶电泳扫描图

五、过氧化物酶同工酶和淀粉酶同工酶谱变化

从图6中可见,A系和B系过氧化物酶同工酶带都出现了4个活性区,在I,Ⅳ活性区两者无差异,而在Ⅱ,Ⅲ活性区A系分别比B系多出两个谱带,差异较明显。许多研究证明,过氧化物酶同工酶对植物体内的吲哚乙酸水平起调节作用,其调节方式是产生吲哚乙酸或钝化吲哚乙酸〔6〕。正是由于过氧化物酶同工酶影响内源激素水平的变化,从而导致不同无性系的细胞分裂与器官分化产生截然不同的结果。

有关报道指出,愈伤组织的器官分化与组织内将分化成器官的、分裂活性高的部位周围淀粉粒的消长有关〔4〕。但从我们的试验结果看出,A系和B系都有4条基本相同的淀粉酶同工酶带(图7),无法说明淀粉酶同工酶对愈伤组织器官发生的影响作用,这个问题有待进一步探讨。

讨 论

核酸和蛋白质含量的变化与细胞分化和器官的形成有着密切的关系。许多研究证明〔1〕,在组织分化和器官形成时核酸以及蛋白质代谢很旺盛。我们试验结果验证了这个结论,在分化培养基上具有分化能力的无性系核酸、蛋白质代谢极为旺盛,明显超过了丧失分化能力的无性系。RNA碱基组分中嘧啶/嘌呤比值也有明显差异,尤其培养的第4~8天(RNA合成盛期)。说明两者所合成的RNA种类是不同的。核酸酶也有类似的趋势。这些生化代谢上的差异反映了两者组织内部各种代谢的区别,表现它们的基因活性是不同的。试验结果说明,已

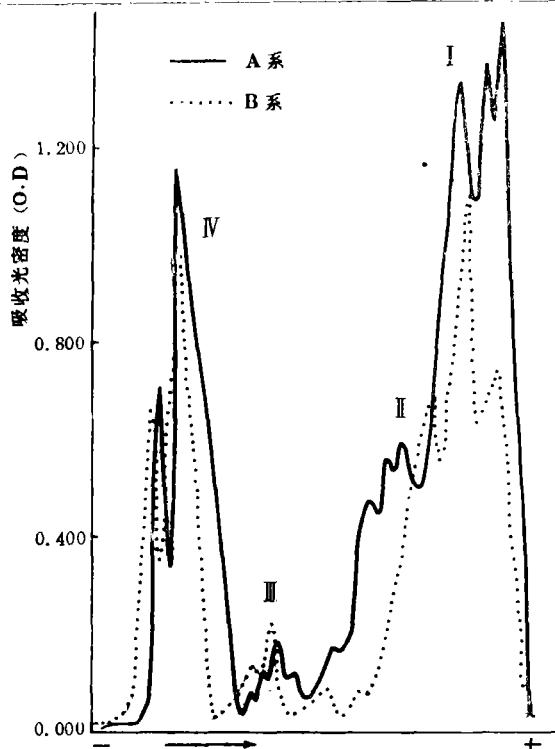


图6 无性系A系和B系的过氧化物酶同工酶扫描图

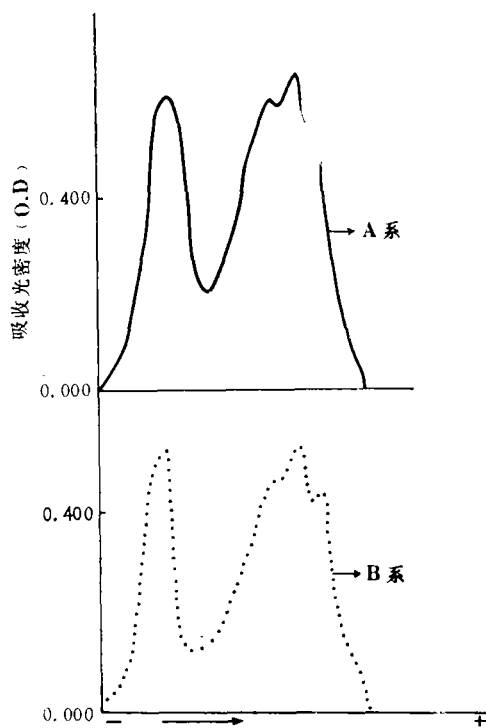


图7 无性系A系和B系的淀粉酶同工酶扫描图

分化的细胞一旦被起动, 细胞分裂就很活跃。这种遗传信息的大量转移为器官形成提供了必要的物质基础, 从而导致两者的核酸、蛋白质含量及合成速度上的差异。Eichhoh 等 (1983) 发现〔8〕, 具有分化能力的烟草髓胚性组织中32~33Kd分子量蛋白质种类比非胚性愈伤组织多。这些与分化有关的蛋白质叫“分化蛋白”。从文献和上述的试验结果可以认为, 组织分化期间需要有特定的蛋白质或酶的参与。试验中出现的特定的扫描蛋白质谱带是基因转录的产物。这种特定的蛋白质或酶的基因, 在生物体内的特定的空间和时间是否表达, 决定于基因表达的调控体系。这一调控体系是以内因为依据, 外因为条件而作用的。在外界因素的诱导下, 与分化有关的特定的基因被起动随之转录成特定的RNA, 再翻译成特定的蛋白质, 使特定的基因表达出来。正如我们试验结果表明, 在分化培养基上A系和B系的RNA碱基组分中嘧啶/嘌呤的比值不尽相同。这足以说明它们已出现了不同种类的遗传信息。在分化培养基上第11天形成的与分化有关的蛋白质和酶带是被调控的那些特定的基因编码, 而丧失分化能力的无性系, 被抑制不能形成与分化有关的蛋白质或酶, 是受其基因编码阻止而失活的结果。Bevan和Nordhcot等也认为分化的重要作用是通过或部分通过影响转录活性加以实现的〔4〕。因此, 要揭示分化能力丧失的实质, 必须进一步了解基因表达的生化控制机制。

参 考 文 献

- [1] 黄大年等: 在继代培养中玉米花粉无性系的核酸和蛋白质变化, 《遗传学报》, 14 (2) 1987: 114—120
- [2] 上海植物生理学会主编: 《植物生理学实验手册》, 上海科技出版社, 1984: 44—46
- [3] 袁晓华等: 《植物生理生化试验》, 高等教育出版社, 1984: 233—246
- [4] 刘涿: 体外分化研究, 《植物生理学通讯》, 1983 (5): 1—6
- [5] 罗士韦等: 植物基因工程研究的现状和问题, 《细胞生物学杂志》, 4 (4) 1982: 1—7
- [6] 王熊等: 烟草组织培养过程中过氧化物同工酶的变化, 《植物生理学报》, 1981 (1): 71—81
- [7] 坂齐等: 水稻愈伤组织再分化过程中, 几种水解酶变化, 《日本作物学会纪事》, 43 (2) 1974: 207—218
- [8] 山口彦之: 植物的分化蛋白质, 《遗传》, 38 (9) 1984: 57
- [9] Lowry, O.H.N., et al: Protein measurement with polin phenol reagent, J.Biol.chem., 1951 (193): 265—275

A Study on Dynamic Changes of Uncleic Acid, Protein and Zyme of Rice Callus in Continuous Culture

Piao Zhongze

(Crop Research Institute, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin)

Abstract

Clones with difference level of differentiation have been made in rice callus continuous culture. The analytic results on differentiation medium showed that DNA, RNA and protein content of clones with differentiation capacity are higher significantly than that of these without differentiation. No obvious difference existed between DNase and RNase vigour. However, there are significant difference in (T+C/A+G) value of RNA base composition. The most significant difference of biochemical metabolism occurred in tissue differentiation grand period. Protein, POD zymogram which are relation with tissure differentiation produce in clones with differentiation capacity during continuous culture. No significant relationship existed between amylum zymogram and cell differentiation.

Key words: Continuous culture; Callus; DNA; RNA; Protein; Zymogram