

铈对马尾松离体胚 DNA、RNA 及蛋白质合成的影响

吕成群* 黄宝灵

(广西大学林学院 南宁 530001)

摘要 用含 $30 \text{ mg L}^{-1} \text{CeCl}_3$ 的培养液培养马尾松离体胚,采用 $^3\text{H-T}$ 、 $^3\text{H-U}$ 和 $^3\text{H-Leu}$ 标记技术测定. 结果表明, CeCl_3 明显提高马尾松离体胚在培养过程中对 DNA、RNA 和蛋白质前体的吸收,以及合成这些生物大分子的能力. CeCl_3 处理在 15 h 开始迅速吸收 DNA 前体和合成 DNA,比 CK 提前 5 h. CeCl_3 处理在 10 h 开始迅速吸收 RNA 前体和合成 RNA,比 CK 提前 5 h. CeCl_3 处理 5 h,蛋白质合成前体的吸收量和蛋白质合成量明显高于 CK. 图 6 参 19

关键词 铈; 马尾松离体胚; 脱氧核糖核酸; 核糖核酸; 蛋白质

CLC S791.248.02 : O614.332

EFFECT OF CERIU ON SYNTHESIS OF DNA, RNA AND PROTEINS OF *PINUS MASSONIANA* EMBRYOS CULTURED *IN VITRO*

LÜ Chengqun* & HUANG Baoling

(Forestry College, Guangxi University, Nanning 530001, China)

Abstract *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro* was set up in 1/2 MS liquium with addition of $30 \text{ mg L}^{-1} \text{CeCl}_3$. The tracer determination were used $^3\text{H-T}$, $^3\text{H-U}$ and $^3\text{H-Leu}$ mark in scintillation counter. The results showed that the treatment with CeCl_3 significantly increased uptake of $^3\text{H-T}$, $^3\text{H-U}$ and $^3\text{H-Leu}$ (Fig 1, Fig 3 and Fig 5) and synthesis of DNA, RNA and protein (Fig 2, Fig 4 and Fig 6) of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro*. Precursor of DNA was uptaked and DNA was synthesized rapidly in the treatment with CeCl_3 at 15 h, ahead of CK 5 h. Precursor of RNA was uptaked and RNA was synthesized rapidly in the treatment with CeCl_3 at 10 h, ahead of CK 5 h. On the other hand, the uptake of protein precursor and synthesis of protein were increased evidently than that of CK. Fig 6, Ref 19

Keywords Cerium; *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro*; DNA; RNA; protein

CLC S791.248.02 : O614.332

目前来看,适量的应用稀土元素对植物的生长发育是有益的^[1],它能促进植物的生理活动和相关的生物化学反应^[2-9],可以确认稀土是植物的有益元素^[1],但稀土元素的作用机理至今仍不清楚.

马尾松是我国南方重要的用材树种和经济树种,分布面积广,是林业生产中的支柱树种. 研究稀土元素对马尾松的生理效应和作用机理,对马尾松的生产及稀土在林业上的推广应用,具有一定的理论意义. 吴兆明等^[1]分析了稀土矿区生长的马尾松稀土含量与非稀土矿区生长的马尾松稀土含量有较大的差别,前者远高于后者. 吕成群和黄宝灵^[8]已证实以 La 和 Ce 为主要成分的农用混合稀土能明显提高种子发芽率和发芽速度,促进胚根和胚芽的生长,降低种子萌

发过程中的过氧化物酶和 IAA 氧化酶活性,提高 IAA 含量. 本实验采用同位素标记技术,进一步研究探讨稀土元素中的铈(氯化物)对马尾松离体胚生物大分子合成的影响,以对稀土元素的作用机理及其调控的分子机制有更多的了解.

1 材料与方法

1.1 材料培养

供试马尾松 (*Pinus massoniana*) 种子由本院造林教研室提供. 取大小、色泽基本一致的种子,剥出胚,用 0.1% HgCl_2 消毒 5 min,无菌水冲洗 4 次,分两组于 1/2 MS 液体培养基中培养,其中一组加入 CeCl_3 , CeCl_3 浓度为 30 mg L^{-1} (经过用 10 mg L^{-1} 、 20 mg L^{-1} 、 30 mg L^{-1} 、 40 mg L^{-1} 、 50 mg L^{-1} 的 CeCl_3 作预备受试验的结果表明,以 30 mg L^{-1} 为宜),另一组不加

CeCl_3 为对照 (CK) 处理. 每一培养瓶含培养液 15 mL, 30 粒种胚, 在黑暗、25 °C 震荡培养, 按规定时间分别取出供同位素测定用. 为了尽量减少测定放射性的污染和废物, 尽量提高测定效率和适当减少工作量, 我们采用的培养时间分别为 5 h、10 h、15 h、20 h、25 h、30 h、40 h、50 h、60 h.

1.2 DNA、RNA 及蛋白质合成实验

参照郑小红等^[10]、Abdul-Baki 等^[11]、Dell Aquila 等^[12] 的实验方法. 收集分别经过规定培养时间的马尾松胚, 分别置于 1 mL 不同的处理液中, 在培养箱中于 25 °C 暗中保温. 蛋白质合成处理液含 ^3H -Leu 9 μCi / mL、青霉素 G 50 μg / mL、硫酸链霉素 50 μg / mL, 保温 5 h, 中间经常摇动通气; DNA 合成处理液含 ^3H -T 2 μCi / mL, 其余同上, 保温 3 h; RNA 合成处理液含 ^3H -U 2 μCi / mL, 其余同上, 保温 3 h. 取出保温一定时间的胚用自来水冲洗, 再分别用冰冷的 10% TCA 和 80% 乙醇冲洗, 吸干置于 -20 °C 冰箱 24 h, 然后分别用 10% TCA (蛋白质合成) 和 80% 乙醇 (DNA、RNA 合成) 研磨, 提取、定容. 各提取液都在 $2\,000 \times g$ 下离心 15 min. 取上清液 0.4 mL, 加 5 mL 闪烁液 (50 g 蔡、4 g PPO、0.4 g POPOP, 溶于 1 L 二氧六环), 于 LKB 液体闪烁计数仪上测定, 用 Bq 值表示蛋白质、DNA 及 RNA 合成前体的吸收量. 沉淀部分用提取液反复多次冲洗、离心, 直至游离标记物冲洗干净. TCA 沉淀加 0.5 mol / L KOH 0.5 mL, 于 80 °C 水浴中水解 30 min, 加 HCl 中和, 取上清液 0.5 mL 加闪烁液测定 ^3H -Leu 掺入量, 表示蛋白质合成量. RNA 合成: 沉淀加 0.5 mL 0.5 mol / L 的 KOH 于 50 °C 水浴中过夜, 加 HCl 中和, 取 0.3 mL 水解液加闪烁液测定 ^3H -U 掺入量, 表示 RNA 合成量. DNA 合成: 沉淀加 1 mL 5% 高氯酸, 70 °C 水解 40 min, 50 °C 水解过夜, 再加碱中和, 取上清液测定 ^3H -T 掺入量, 表示 DNA 合成量.

以上试验重复 3 次.

2 结果

2.1 CeCl_3 处理对马尾松离体胚 DNA 合成的影响

由图 1 可见, 不同处理的培养液中的马尾松离体胚在培养过程中 DNA 合成前体 ^3H -T 的吸收量不同. 无 CeCl_3 处理 (CK), 在前 20 h 吸收量一直维持在较低的水平, 到 20 h 才明显增快. 加 CeCl_3 处理的培养过程中, 从 15 h 开始就明显增快, 比 CK (20 h) 提早了 5 h. 从图 1 还可看出, 无 CeCl_3 培养的离体胚对 ^3H -T 的吸收量到 30 h 以后就保持相对的恒定, 而加

CeCl_3 的吸收量上升保持到 40 h, 40 h 以后才维持相对恒定. 在整个培养进程中, CeCl_3 处理比 CK 处理的吸收量明显增多.

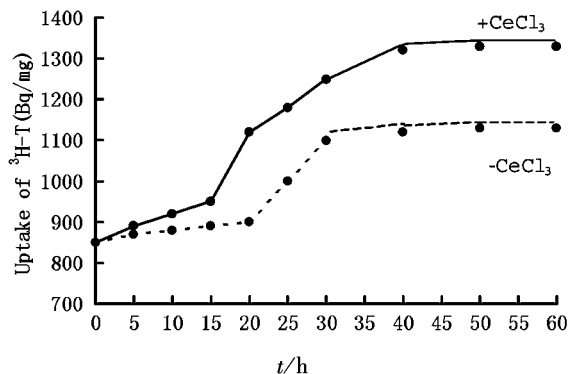


图 1 不同处理离体马尾松胚对 ^3H -T 的吸收
Fig 1 ^3H -T uptake of different treatments of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro* during germination

由图 2 可见, 两种不同处理的离体胚在培养过程中, DNA 合成活力 (^3H -T 对 DNA 的掺入量) 有显著的不同. CeCl_3 处理的在 15 h 开始加快, 上升的趋势维持到 50 h. 而无 CeCl_3 的 CK 处理, DNA 合成活力比要低得多, 在 20 h 才出现明显的提高, 比 CeCl_3 处理落后 5 h, 到 40 h 即开始出现平缓趋势.

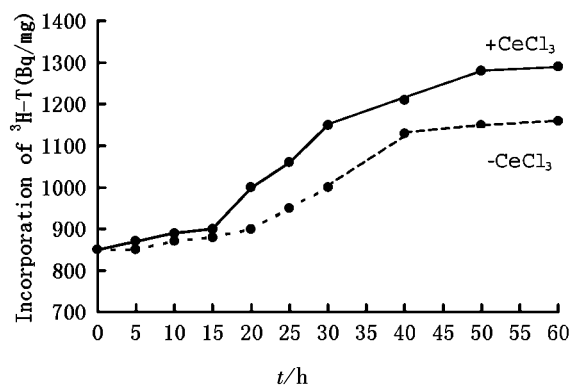


图 2 不同处理离体马尾松胚 DNA 合成活力
Fig 2 DNA syngthesis of different treatments of *Pinus massoniana* emtryos cultured *in vitro* during germination

2.2 CeCl_3 处理对马尾松离体胚 RNA 合成的影响

从图 3 可见, 两种不同处理的马尾松离体胚在培养过程中对 RNA 合成前体 ^3H -U 的吸收量有明显的差异. 无 CeCl_3 (CK) 处理的吸收曲线表明, 15 h 以前有极少量的 RNA 前体被吸收, 15 h 以后才有较为明显的吸收. 而 CeCl_3 处理, 在 10 h 即开始有明显的 RNA 前体 ^3H -U 被吸收, 比 CK 提早 5 h. 两种处理均在 50 h 后开始出现平缓的吸收曲线.

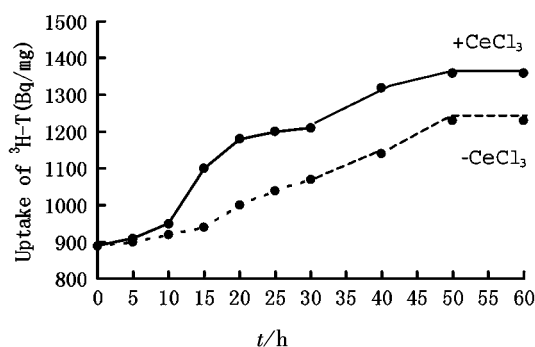
图3 不同处理离体马尾松胚对 $^3\text{H-U}$ 的吸收

Fig 3 $^3\text{H-U}$ uptake of different treatments of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro* during germination

从图4可见, CeCl_3 处理明显提高马尾松离体胚在培养过程中RNA合成活力($^3\text{H-U}$ 对RNA的掺入量). 图中曲线表明, 经 CeCl_3 处理的RNA合成活力在10 h开始即比无 CeCl_3 (CK)有所提高, 并且一直保持在较高水平. 无 CeCl_3 (CK)处理的离体胚, RNA合成活力在培养过程中也有所增加, 但到15 h才出现明显加快, 要比 CeCl_3 处理(10 h)晚5 h. 在50 h后, 两种处理的吸收曲线均出现平缓.

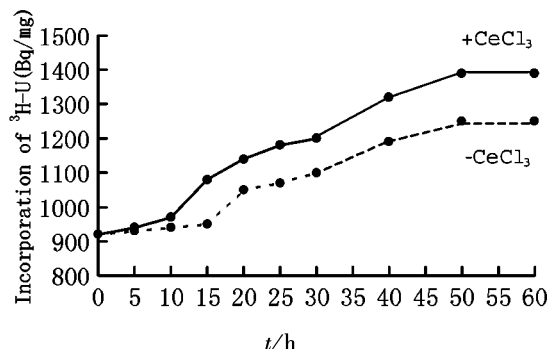


图4 不同处理离体马尾松胚RNA合成活力

Fig 4 RNA synthesis of different treatments of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro* during germination

2.3 CeCl_3 处理对马尾松离体胚蛋白质合成的影响

由图5可见, 两种不同处理的马尾松离体胚在培养过程中对蛋白质合成前体 $^3\text{H-Leu}$ 的吸收量有很大差异. 虽然两种处理培养过程中的马尾松离体胚对 $^3\text{H-Leu}$ 的吸收量都不断增加, 但 CeCl_3 处理的吸收量明显高于CK处理, 从10 h开始就可以看出与CK的明显差异, 在15 h~30 h吸收量剧增. 而无 CeCl_3 的CK处理的吸收特点是, 随着培养的时间进程, 吸收量平缓增加.

由图6可见, CeCl_3 明显提高马尾松离体胚在培

养过程中的蛋白质合成活力($^3\text{H-Leu}$ 对蛋白质的掺入量), 从5 h开始即可看到它明显高于CK, 而且随着培养时间进程, 这种差异在增大. 无 CeCl_3 处理的蛋白质合成曲线的特点是, 15 h~20 h出现一个平缓期, 20 h开始合成速度有所加快, 但在40 h开始又出现相对的平缓吸收.

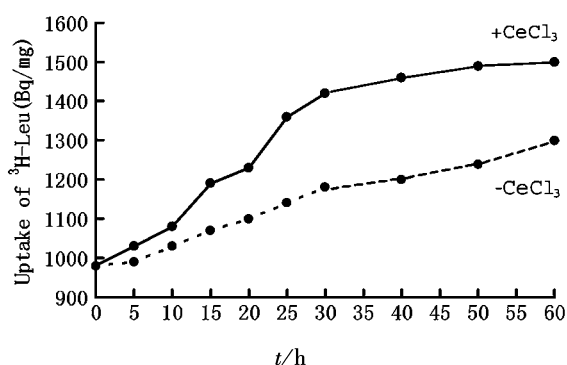
图5 不同处理离体马尾松胚对 $^3\text{H-Leu}$ 的吸收

Fig 5 $^3\text{H-Leu}$ uptake of different treatments of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro* during germination

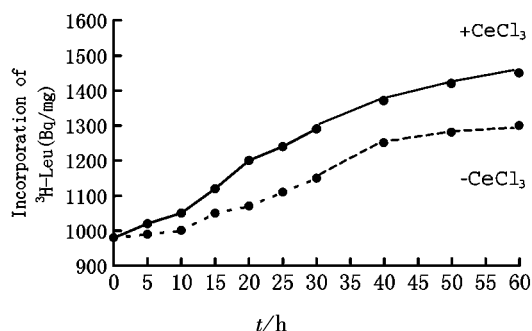


图6 不同处理离体马尾松胚蛋白质合成活力

Fig 6 Protein synthesis of different treatments of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro* during germination

3 讨论

为了探讨稀土元素对马尾松种子萌发的作用机理, 我们加入单一稀土元素铈到马尾松离体胚培养液中进行培养, 观察其生物大分子合成动态. 实验结果证明, 铈能明显提高马尾松种子离体胚蛋白质、RNA和DNA的合成能力.

随着种子吸胀、萌发, 生命活动逐渐加强, 并伴随着生物大分子的合成, 其中合成的蛋白质、RNA和DNA是种子萌发生长的基础. 铈提高马尾松种子离体胚吸胀初期进行的蛋白质合成以及随后发生的RNA转录可能具有全面恢复细胞活力、激发各种生理生化过程的作用, 为降低过氧化物酶和IAA氧化酶活性, 提高IAA含量^[8], 为以后DNA复制与细胞分裂

以及胚芽、胚根的生长提供物质基础. 其中, 蛋白质作为种子萌发和生长的主要氮源^[13], 它的含量对种子萌发和生长有着重要的影响.

已知成熟种子内不仅具备完整的蛋白质合成系统, 而且含有成熟的蛋白质合成模板 mRNA, 吸胀初期, 依靠这些模板进行蛋白质合成^[14~16]. 成熟种胚的贮藏 mRNA 具有一定的生理意义, 实验证明, 由这类贮藏 mRNA 所编码的酶均与物质转化及呼吸代谢有关, 是种子萌发所必需的^[17~19]. 但仅依靠植物体本身现有的蛋白质和 mRNA 是不能维持长久的, 必须要合成新的蛋白质、RNA 和 DNA, 从而促进生长. 本实验所用的马尾松种子质量(大小、色泽、采收时间)是一致的, 但铈在种子离体胚培养过程中, 能明显提高 RNA 和 DNA 的合成能力, 这对于揭示铈对种子萌发及其调控机理, 都是非常有意义的.

种子萌发过程伴随着细胞内多种生命活动与代谢的改变. 在这个过程中, 生物大分子蛋白质、RNA 和 DNA 合成能力的改变起着重要作用. RNA 和 DNA 合成活力的变化直接反映了种胚生长过程中的基因表达. 铈作为一种子外部因素, 影响着种胚内部代谢活动, 使代谢能力提高, 从而提高种子发芽速度, 促进胚根和胚芽的生长.

References

- 1 吴兆明. 植物营养中新的重要、有益和毒害元素. 见: 吴相钰, 赵微平, 匡廷云. 植物生理补充教材——纪念 56 年教学研讨会 40 周年. 北京: 1996. 1 ~ 26, 7
- 2 Lü CQ (吕成群), Huang BL (黄宝灵). Physiological effects of rare-earth element on *Camellia oleifera* seedling. *J Guangxi Agric Coll* (广西农学院学报), 1991, **10**(1): 58 ~ 64
- 3 Hu QH (胡勤海), Ye ZJ (叶兆杰). Plant Physiological effects of rare-earth element on plants. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1996, **32**: 296 ~ 300
- 4 Xie LL (谢丽玲). Effect of rare-earth elements—Ce(NO)₃ on seedling growth of *Saintpaulia ionantha* and *Zantedeschia aethiopica* in vitro. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1999, **35**: 202 ~ 203
- 5 Hong FS (洪法水), Fang NH (方能虎), Zhao GW (赵贵文). Physiological effects of Ce(NO)₃ on promoting germination of rice seed. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, **26**: 79 ~ 82
- 6 Wang DF (汪东风), Shao XG (邵学广), Wang CH (王常红), Fang NH (方能虎), Zhao GW (赵贵文). Analysis on effects of spraying rare-earth in tea garden on tea output and quality. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, **26**: 455 ~ 461
- 7 Hong FS (洪法水), Fang NH (方能虎), Wei ZG (魏正贵), Zhao GW (赵贵文). Effect of Cerium on aged seed germination of rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, **26**: 937 ~ 941
- 8 Lü CQ (吕成群), Huang BL (黄宝灵), Mou JP (牟继平). Physiological effects of rare-earth element on the seed germination of *Pinus massoniana*. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 1999, **20**(3): 71 ~ 74
- 9 Lü CQ (吕成群), Huang BL (黄宝灵). Studies of growth promoting and physiological effects of rare-earth on *E. grandis* × *E. urophylla* seedlings. *J Central South For Univ* (中南林学院学报), 2001, **21**: 61 ~ 64
- 10 Zheng XH (郑小红), Fu JR (傅家瑞). The effect of per-chilling on seed vigor, the synthesis of nucleic acid, protein and ATP level in embryonic axis of peanut. *Acta Sci Nat Univ Sunyateni* (中山大学学报), 1987, **1**: 21 ~ 29
- 11 Abdul-Baki AA, Chand GR. Effect of rapid ageing on nucleic acid protein synthesis by embryonic axes during germination. *Seed Sci Technol*, 1977, **5**: 689 ~ 698
- 12 Dell Aquila A, Taranto G. Cell division and DNA synthesis during osmo-priming treatment and following germination in aged wheat embryos. *Seed Sci Technol*, 1986, **14**: 333 ~ 341
- 13 Huang SZ (黄上志), Fu JR (傅家瑞). Development and storage protein accumulation in peanut seed. *Acta Phytophysiological Sin* (植物生理学报), 1992, **18**: 142 ~ 150
- 14 Zhang XH (张兴海), Tang XH (唐锡华). Sequential activation of the biosynthesis of macromolecules in rice embryos. *Acta Phytophyiol Sin* (植物生理学报), 1986, **12**: 58 ~ 64
- 15 Bewley JD, Black M. Physiology and biochemistry of seed in relation to germination, viability, dormancy and environment control. *Springer - Verlag*, 1982. 285 ~ 326
- 16 Bewley JD, Black M. Seeds physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1985. 312 ~ 347
- 17 Akiyama T, Uchmiya H, Suzuki H. Gibberellic acid-stimulated de novo synthesis of a particular isozyme of acid phosphatase in wheat half-seed. *Plant Cell Physiol*, 1981, **22**: 029 ~ 1034
- 18 Lakhani S, Thiru AN, Sachar RC. Synthesis of poly (A) polymerase from conserved messenger RNA in germinating excised embryos of wheat. *Phytochemistry*, 1983, **22**: 1561 ~ 1566
- 19 Aspart L, Meyer Y, Laroche M, Penon P. Developmental regulation of the synthesis of proteins encoded by stored mRNA in radish embryos. *Plant Physiol*, 1984, **76**: 664 ~ 673