

激光对香石竹愈伤组织生长和分化的影响

陈汝民 李娘辉 刘颂豪

(华南师范大学生物系, 激光生命科学研究所)

徐祥浩

(农业生物系)

摘要 用一定剂量的激光处理香石竹愈伤组织能显著促进其生长和分化, 其中用 20 mW 氩氟激光处理可使愈伤组织鲜重比对照增加 170%, 用 0.1 W 和 1 W 氩离子激光处理可明显促进芽的分化。研究表明, 引起上述结果的原因与光质无明显关系而与激光引起的某些特殊蛋白质的产生有关。

关键词 激光; 香石竹; 愈伤组织; 鲜重; 分化; 蛋白质; 同工酶

用一定剂量的激光处理能引起生物体遗传物质发生变异这一现象已为许多研究结果所证实^[3,4], 其原因与激光引起细胞核损伤有关^[1]然而, 激光处理除能引起明显的遗传性状变异外, 还能产生许多非遗传性的, 属于发育生理方面的变化, 目前这方面的报道尚少, 本研究以香石竹愈伤组织为材料, 研究了不同波长, 不同剂量激光对其生长和发育的影响及其在蛋白质和酶水平上的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验以香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 愈伤组织为材料。

1.2 材料的培养

切取香石竹茎尖切段, 经消毒后植入 Ms+2, 4-D+6-BA 的生长培养基中培养, 培养条件为: 光照 1500 Lx, 光/暗=12 h/12 h 温度为 27±2℃, 30 天后取愈伤组织转入新的培养基, 培养 10 天后待用。

1.3 材料的激光处理

取培养 40 天的香石竹愈伤组织进行激光处理, 激光的类型、波长、能量、处理时间和剂量见表 1。光斑直径为 0.5 cm, 处理后, 一部分用生长培养基培养, 另一部分转入分化培养基。

表 1 激光处理参数

光源	波长	能量	处理时间和剂量
氩氟激光	632.8 nm	20 mW	102 mW/cm ² ; 10 min、15 min、20 min
氩离子激光	488.0 nm	0.1 W	0.51 W/cm ² ; 10 S、15 S、20 S
		1.0 W	5.09 W/cm ² ; 5 S、10 S、15 S

1991-12-09 收稿

1.4 红光和蓝光处理

取培养 40 天的香石竹愈伤组织，置于红光（波长 625~680 nm，光强 2 W/m²）和蓝光（波长 420~470 nm，光强 4 W/m²）下光照 30 min 后再转入生长培养基和分化培养基。

1.5 叶绿素测定

按 Arnon^[4]方法进行。

1.6 蛋白质分析

取材料 10 g，加入 10 ml 缓冲液 I (HEPERS 50 m mol/L、山梨糖醇 0.33 mol/L 用 NaOH 调 pH 至 7.0)，在 4℃ 条件下研磨成匀浆，经过滤后于 4 000 ×g 离心 20 min，取上清液做凝胶电泳分离蛋白质。

取样品 1 ml，加入 0.5 ml 缓冲液 I (1 mol/L Na₂CO₃ 0.2 ml；二硫苏糖醇 30 mg；10% 十二烷基磺酸锂 1.0 ml；60% 蔗糖 1.0 ml；H₂O 0.3 ml；)，按 Peccioni^[5]方法进行凝胶电泳，电流强度为 6 mA，电泳 16 h 后用考马斯蓝染色。

1.8 同工酶测定

取材料 10 g，加入缓冲液 I 10 ml，低温下研磨成匀浆，于 3000 ×g 离心 10 min，上清液待测。

取上清液 1 ml，按陆土伟等^[2]方法进行脂酶同工酶和过氧化物酶同工酶的分析。

2 结果和讨论

2.1 激光对愈伤组织鲜重的影响

研究结果表明，用氩氮激光处理，能显著加快伤组织的生长（图 1），其中以剂量为 102mw/cm²；20 min 的处理组长势最好，在处理 50 天，愈伤组织的鲜重比对照约增加了 170%，效果是十分明显的。

然而，并不是任何激光处理都能加快愈伤组织的生长，用氩离子激光处理的结果表明，各种剂量的处理均不引起加快生长的效果（图 2）、培养 50 天后，处理和对照组的材料鲜重没有明显的差异，而且增重的速度还稍低于对照。

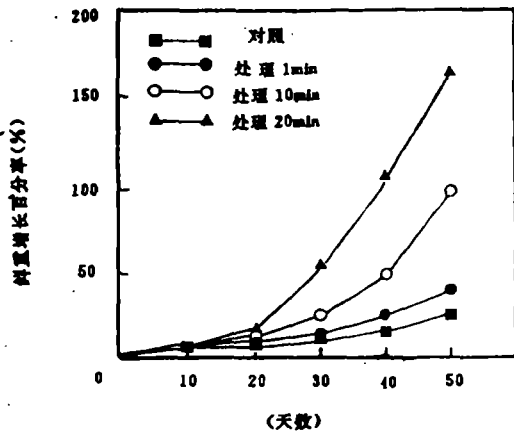


图1 氩氮激光处理对香石竹愈伤组织生长的影响

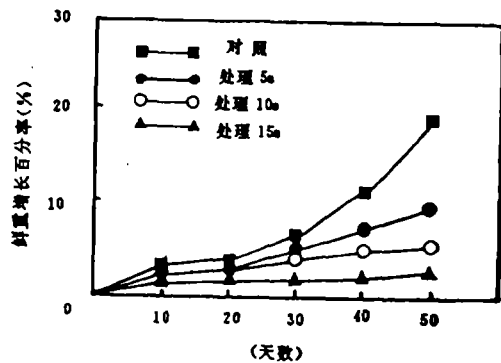


图2 氩离子激光处理对香石竹愈伤组织生长的影响

2.2 激光对愈伤组织芽分化的影响

从图 3, 4 可见，用氩离子激光处理后，愈伤组织的芽分化速度明显快于对照（由于芽

分化的同时产生叶绿体，所以本文以叶绿素的增加速度来表示芽的分化)。处理后 50 天分析结果表明，处理剂量为 0.51 W/cm^2 ; 10 s (图 1) 和 5.09 W/cm^2 ; 5 S (图 2) 两组材料，其叶绿素含量分别比对照高 500% 和 366%，效果显著。

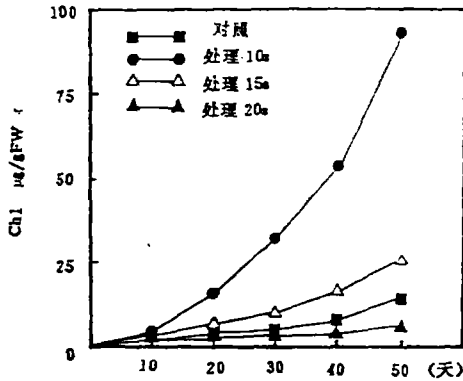


图 3 氩离子激光对香石竹愈伤组织芽分化的影响。
注：处理剂量为 $0.51 \text{ W/cm}^2 \cdot \text{时间}$

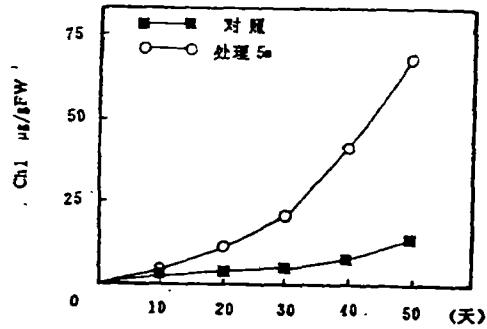


图 4 氩离子激光对香石竹愈伤组织芽分化的影响。
注：处理剂量为 $5.09 \text{ W/cm}^2 \cdot \text{时间}$

然而用氩氦激光处理的材料却未见分化的产生(图 5)，其叶绿素含量与对照无差异，且含量均很低。

2.3 光质对愈伤组织生长和分化的影响

考虑到氩氦激光与氩离子激光的波长不同(氩氦激光为 632.8 nm 的红光，而氩离子激光则是 488.0 nm 的蓝绿光)。因此，对愈伤组织的生长和分化的影响是否由于光质不同而引起的，为此我们作了进一步的分析，结果示于图 6 和图 7。从图中可见，经红光或蓝光处理后，对愈伤组织的生长和分化均未能引起明显的作用，鲜重的变化与对照没有明显差别(图 6)。虽然叶绿素含量在 50 天后比对照稍有增多(图 7)，但与用氩离子激光处理的效果是显然不同的。

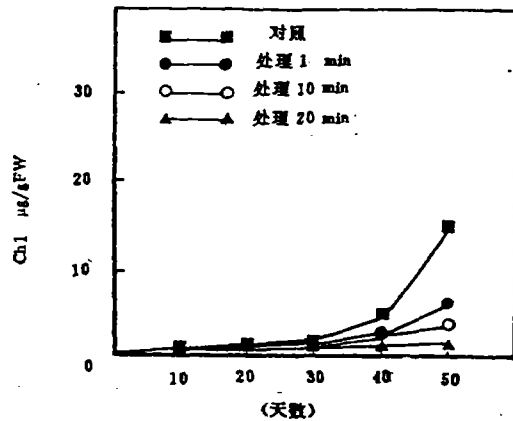


图 5 氩氦激光处理对香石竹愈伤组织芽分化的影响。

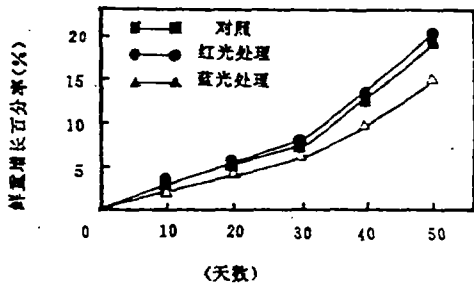


图 6 光质对香石竹愈伤组织生长的影响

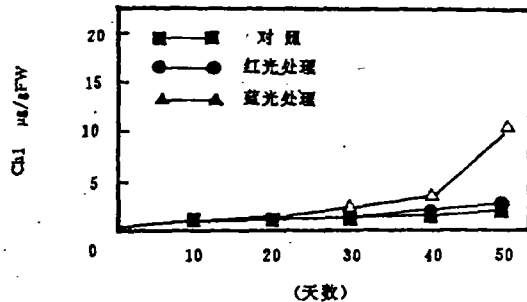


图 7 光质对香石竹愈伤组织芽分化的影响

2.4 激光对蛋白质种类的影响

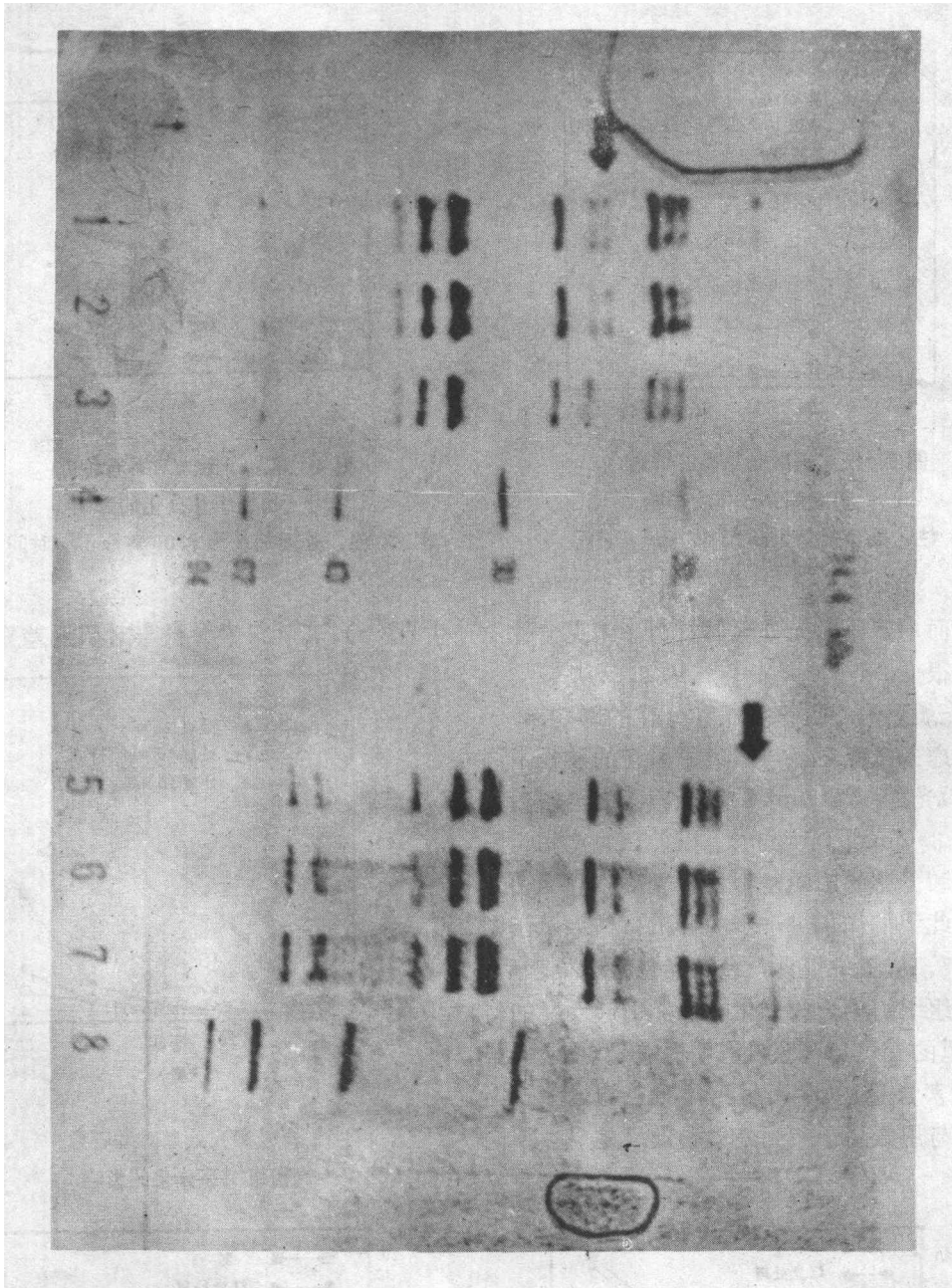


图8 激光处理后香石竹愈组织蛋白质类型的变化

1, 氩离子激光处理 0.5 W/cm^2 , 10 s; 2, 氩离子激光处理 0.5 W/cm^2 , 15 s; 3, 对照; 4, 标准蛋白;
5, 氩氟激光处理 102 mW/cm^2 , 15 min; 6, 氩氟激光处理 102 mW/cm^2 , 20 min; 7, 对照; 8, 标准蛋白

激光处理能促进愈伤组织的生长和分化, 然而, 不同激光的处理效果不同, 为进一步了解其原因, 本文对激光处理后材料的蛋白类型进行了分析, 结果示于图 8, 从图中可见, 氩氛激光处理后, 愈伤组织中 35 kDa 和 22 kDa 蛋白的含量高于对照, 而且出现了一条约 26 kDa 的新蛋白带。而用氩离子激光处理后, 大分子的蛋白质与对照无明显差异, 但却出现了两条分子量约 16 kDa 的新的蛋白带, 这进一步说明氩氛激光和氩离子激光的处理效果是不同的。

2.5 激光对同工酶的影响

激光对同工酶亦有一定的影响, 研究结果表明, 无论是用氩氛激光还是用氩离子激光处理, 材料的过氧化物酶同工酶的酶谱均有变化(图 9), 并出现新的酶带。然而, 不同激光的处理, 所影响的结果是不同的, 如用氩氛激光处理后, 在 3a 和 4a 区出现了新的酶带, 而用氩离子激光处理, 则在 4a 区产生新的酶带。本研究结果还表明, 激光对脂酶同工酶无明显影响, 这可能与材料中该酶活力低, 难以准确测定有关。

上述结果表明, 氩氛激光处理能明显促进香石竹愈伤组织的生长, 而氩离子激光处理则能促进愈伤组织的分化, 引起这种效果的原因与光质无直接的关系而与激光处理后引起蛋白质合成反应变化, 产生新的蛋白质有关。许多实验表明, 新蛋白质的产生和同工酶的变化是与激光所具有的多种物理因素的作用有关的, 其中包括了光量子、电磁波、热效应等多方面的因素, 这些物理因素作用于植物细胞的细胞核或胞内膜系统, 前者则使核内遗传物质受激产生某种变异, 导致新蛋白质的产生。用高剂量的激光处理, 可产生这种结果。后者是细胞内微结构受激产生变化。这种变化类似于细胞在各种胁迫条件下产生的应激反应, 亦能引起新蛋白的产生和同工酶的变化, 通常较低剂量的激光进行处理可产生这类效果。本研究用氩氛激光和氩离子激光进行处理和比较, 进一步证明了上述的分析, 并且发现了激光对植物愈伤组织生长发育有影响及其可能原因, 然而细胞是一个十分复杂的系统, 激光处理后引起细胞变化的过程、信号的感受和作用等还有待于进一步的探讨。

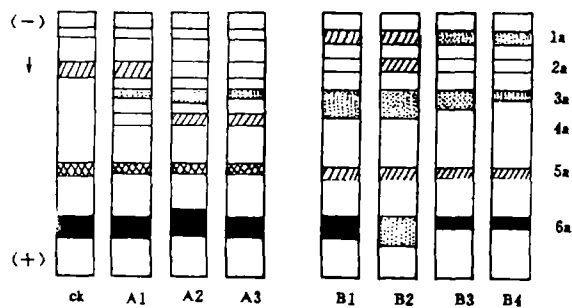


图 9 激光处理后香石竹愈伤组织同工酶谱的变化。

8, ck: 对照 A1: 氩氛激光处理 102 mW/cm^2 ; 10 min A2: 氩氛激光处理 102 mW/cm^2 ; 20 min. A3: 氩氛激光处理 102 mW/cm^2 ; 30 min. B1 氩离子激光处理 5.09 W/cm^2 ; 5 s. B2: 氩离子激光处理 0.51 W/cm^2 ; 10 s. B3: 氩离子激光处理 0.51 W/cm^2 ; 15 s. B4 氩离子激光处理 0.51 W/cm^2 ; 20 s.

致谢 华南师范大学生物系 87 级李应杰, 朱晓明, 傅玲、周碧珊; 激光生命科学实验中心郭周义等同志参加了部分工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 伍青源, 李红燕, 王小阳. 激光诱发蚕豆染色体畸变及其对酶同工酶的影响初探. 生物学研究, 1990, 1, 54~57
- 2 陆士伟, 赖天斌. 同工酶在农业上的应用. 广州: 广东科技出版社, 1987, 3~80
- 3 Weber B, Monajembashi S, Wolfrum J, et al. Genetic changes induced in higher plant cells by a laser microbeam. *Physiologia plantarum*, 1990, 79, 190~193
- 4 Weber G, Monajembashi S, Greulich K, et al. Genetic manipulation of plant cell and organelles with a laser microbeam. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1988, 12, 219~222
- 5 Arnon D I, Meswain B D, Tsuchimoto H Y, et al. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. *Biochem Biophys Acta*, 1974, 357, 231~245
- 6 Piccion R, G Bellemare and N H Chua. Methods of polyacrylamide gel electrophoresis in the analysis and preparation of plant polypeptides. In M. Edelman et al. eds. *Methods in Chloroplast Molecular Biology*. Elsevier Biomedical press. New York, 1982, 985~1081

EFFECTS OF LASER RADIATION ON THE GROWTH AND
DIFFERENTIATION OF THE CALLUS OF THE CLOVE GILLY—FLOWER

Chen Rumin Li Nianghui Liu Songhao

(Biology Department, Institute of Laser and Life Science Research Center, South China Normal University)

Xu Xianghao

(Agrobiology Department, South China Agriculture University)

Abstract The growth and differentiation of the Callus of the Clove Gilly—flower were promoted when treated with laser beam. He-Ne laser (20 mw) made the callus grow rapidly and the fresh weight of callus tissue increased by 170% as compared with the control, and the differentiation of bud was promoted remarkably after irradiation by Ar⁺ laser (0.1w and 1w). Moreover, some special proteins emerged in calluses which were treated by laser beam. It seems that the promotion of the growth and differentiation of callus tissue are related to the appearance of certain proteins.

Key words Laser irradiation; Clove Gilly—flower; Callus tissue; Fresh weight; Differentiation; protein; Isoenzyme