- 5 Verma D P S, Shoemaker R C. Soybean Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1995
- 6 Keim P, Diers B W, Olson T C, et al. RFLP Mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. Genetics, 1990, 126: 735~ 742
- 7 Diers B W, Fehr W, Keim P, et al. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. Theor Appl Genet, 1992, 83: 608~ 612
- 8 Skorupska H T, Shoemaker R C, Warner A, et al. Restriction fragment length polymorphism in soybean germplasm of the Southern USA. Crop Sci, 1993, 33: 1 169~ 1 176
- 9 Lark K G, Weisemann J M, Matthews B F, et al. A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars: 'Minsoy and Noir 1'. Theor Appl Genet, 1993, 86: 901~ 906
- 10 Shoemaker R C, Specht J E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. Crop Sci, 1995, 35: 436~ 446

(1998-02-23 收稿, 1998-05-12 收修改稿)

钙调素 mRNA 在烟草花药发育过程中的原位定位

陈绍荣 吕应堂 杨弘远

(武汉大学生命科学院植物生殖生物学研究室, 武汉 430072)

摘要 利用 RNA 原位杂交技术, 以地高辛标记的反义 RNA 为探针, 研究了烟草花药发育过程中钙调素 mRNA 时空分布特点. 烟草花药各个不同发育阶段均有钙调素 mRNA 的分布, 但表达水平有明显的时空差异. 花药发育早期, 钙调素 mRNA 表达很强, 主要分布于表皮、绒毡层和药隔维管薄壁细胞等, 尤其是即将进行减数分裂的小孢子母细胞核部位和减数分裂时期的染色体部位有较多的 mRNA 积累. 随着花药的发育, 药壁和花粉中的表达量逐渐减弱. 到成熟花粉期, 仅药壁表皮和维管薄壁细胞中仍有较强的阳性反应. 结果暗示, 烟草花药发育过程中钙调素 mRNA 的时空表达可能与细胞分裂、花粉发育和物质转运密切相关.

关键词 钙调素 mRNA 烟草 花药 原位杂交

钙调素(CaM)作为钙(Ca^{2+})信号系统的重要成员之一, 在调节植物生长发育过程中起着关键性作用^[1]. 虽然钙调素在真核细胞中广泛分布, 但在不同组织中的含量有很大的差异, 并随细胞生理状态不同和环境或激素的刺激而发生明显的变化^[2]. 研究钙调素表达水平在植物生长发育过程中的时空变化, 对于探讨其作用机制有着重要意义. Jena 等人^[3]用 Northern 杂交检测到钙调素 mRNA 在马铃薯块茎形成过程中大量积累, Breton 等人^[4]也测得玉米胚胎发生过程中钙调素 mRNA 表达水平的变化, 但对不同组织中 mRNA 表达的空间分布不能确定. RNA 原位杂交技术能够从细胞水平精确定位基因表达产物的时空分布, 在国际上已被广泛应用于植物发育生物学中基因表达调控研究^[5], 但尚未见有关花药发育过程中钙调素基因表达原位定位研究的报道. 我们以地高辛(digoxigenin)标记的反义 RNA 为探针, 研究了烟草花药发育过程中钙调素 mRNA 时空分布的特点及其生理意义.

1 材料与方法

(1) 材料. 烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 小孢子母细胞、减数分裂、四分体、游离小孢子和成熟花粉等各个不同发育时期的花药用4%多聚甲醛固定, 常规酒精系列脱水, 石蜡切片, 切片厚度10 μm .

钙调素 cDNA 由 Sasaki 等人^[6]从水稻中分离, 日本 NIAR(National Institute of Agrobiological Resources) 和 STATF(Institute of Society of Tech_Innovation in Agriculture, Forestry and Fisheries) 水稻基因组研究计划 (Japanese rice genome research program, RGP) Nagamura 博士提供, 长度为0.8kb, 克隆在 pBluescript II SK⁺ 质粒中, 克隆位点为 Sal *iv*/Not *iv*, 两端分别有 T7 和 T3 RNA 多聚酶启动子. 按 Sambrook 等人^[7]的方法转化、扩增和提取质粒, 受体菌株为大肠杆菌 TG1.

Not *iv*和 Sal *iv*内切酶、T3 和 T7 多聚酶以及地高辛标记检测试剂等分别购自 BM, Promega 和 Sigma 公司.

(2) RNA 原位杂交. 按文献[8]的方法进行 RNA 原位杂交. 质粒用 sal *iv*或 Not *iv*内切酶线性化后, 前者用 T3、后者用 T7 RNA 多聚酶分别体外转录地高辛标记的反义 RNA 和有义 RNA(对照). 切片经预杂交处理后, 用反义 RNA 和有义 RNA 探针分别作原位杂交. 经洗涤, 再用带有碱性磷酸化酶的抗地高辛抗体(anti-DIG-AP) 做免疫反应, 用氮蓝四唑(NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP) 显色, 封片观察. 有蓝紫色沉淀产生的为阳性反应.

2 结果

原位杂交结果显示, 烟草花药从小孢子母细胞、减数分裂、四分体、游离小孢子到成熟花粉等各个不同发育阶段均有钙调素 mRNA 的分布, 但表达水平和部位有明显的差异. 用 T7 RNA 多聚酶体外转录的钙调素有义 RNA 探针原位杂交, 各个时期的切片除适量背景外均无阳性反应(图 1(j)).

小孢子母细胞时期, 表皮、药室内壁、中层、环形细胞团(药室交界处, 与裂药有关)、绒毡层和小孢子母细胞内均有很强的阳性反应, 尤其是即将进行减数分裂的小孢子母细胞中细胞核部位有较多的 mRNA 积累(图 1(a)). 药隔尤其是其中的维管薄壁细胞也有较强的阳性反应.

小孢子母细胞减数分裂时期, 药壁各层细胞中仍保持很强的阳性反应(图 1(d)), 药隔部位的表达量也没有改变. 在减数分裂 *iv*和减数分裂 ④ 时期染色体部位有较多的 mRNA 积累, 使染色体不经常规染色而清晰可见(图 1(b)、(c)). 前期的核消失和末期的核重构部位也有明显的 mRNA 积累.

四分体时期药壁表皮杂交信号仍然很强, 但在药室内壁和已逐步退化的中层与绒毡层中有所减弱(图 1(e)). 四分体内也有较多的 mRNA 积累(图 1(f)). 药隔内除维管组织部位外有所减弱.

游离小孢子时期各部位 mRNA 表达量明显降低, 仅表皮及维管组织部位保持较高的水平, 且 mRNA 的分布集中在细胞周边部位(图 1(g)).

成熟花粉时期的表皮和维管组织部位仍保持一定的表达水平, 尤其表皮毛上的表达量还很高, 而药室内壁、退化的绒毡层、成熟花粉粒以及药隔的其他部位表达量很低, 仅在细胞周边部位有少量分布(图 1(h)、(i)).

图1 烟草花药发育各期钙调素反义RNA探针原位杂交的定位观察

(a) 小孢子母细胞时期花药横切面, $\times 405$; (b) 减数分裂iv中期, $\times 900$; (c) 减数分裂 IV 后期, $\times 900$; (d) 减数分裂时期药壁, $\times 900$; (e) 四分体时期药壁, $\times 900$; (f) 小孢子四分体, $\times 900$; (g) 游离小孢子时期花药横切面, $\times 198$; (h) 成熟花粉时期花药横切面, $\times 405$; (i) 成熟花粉时期药隔维管组织部位, $\times 198$; (j) 有义RNA探针原位杂交游离小孢子时期花药横切面(对照), $\times 90$. co为药隔; eh为表皮毛; en为药室内壁; ep为表皮; mc为小孢子母细胞; mi为小孢子; po为花粉; te为小孢子四分体; v为药隔维管组织

3 讨论

钙调素在植物组织中分布广泛、功能复杂, 很难明确确定其单一生理功能. 研究钙调素表

达水平与植物生长发育过程中生理表现的相关性,是探讨钙调素作用机制的一种重要手段^[9].

Means 等人^[10]发现钙调素在细胞周期的 G1~S 期之间大量合成,从而推测钙调素在 DNA 合成调节中起重要作用. 我们的实验结果也证实,在花药发育早期,细胞处于分裂旺盛阶段,钙调素 mRNA 表达水平最高.

细胞分裂、生长过程中,细胞骨架系统中的微管起着重要的作用,如纤维素微纤丝定向、细胞核定位、染色体移动和新细胞板组装等人^[11]. Fisher 等人^[12]发现钙调素有稳定微管的作用. 我们的实验结果也表明,小孢子母细胞减数分裂的染色体移动过程中以及各种细胞生长发育早期有大量钙调素 mRNA 积累,而成熟细胞中却表达水平明显降低.

许多研究指出,环境刺激对钙调素表达水平的影响很大^[13,14]. 烟草花药表皮中钙调素 mRNA 持续表达. 究其原因,推测不仅因为表皮细胞在发育早期连续分裂,而且还可能由于器官表面不断接受环境刺激,并通过 Ca^{2+} / CaM 系统的信号传导而引起生理反应,值得进一步探讨.

Dauwalder 等人^[15]和 Lin 等人^[16]用组织免疫化学方法检测到钙调素分布于木质部管状分子中,并推测与物质运输有关. 我们的实验结果显示,烟草花药药隔维管薄壁细胞中有钙调素 mRNA 的持续表达. 维管薄壁细胞的主要功能是在维管组织中起物质装卸转运作用,钙调素的表达可能与物质的主动转运有关,但与管状分子中的钙调素分布有何相关性,尚未见有关报道.

本文首次对钙调素 mRNA 在植物雄蕊发育过程中的时空表达特征作了初步研究,关于钙调素基因表达在植物有性生殖过程中的作用机制,还有待更加深入的研究.

致谢 感谢日本水稻基因组研究计划 Nagmura 博士惠赠钙调素 cDNA. 本工作为国家自然科学基金(批准号:39730260)重点资助项目.

参 考 文 献

- 1 Roberts D M, Lukas T J, Watterson D M. Structure, function, and mechanism of action of calmodulin. *Crit Rev Plant Sci*, 1986, 4: 311~ 3 19
- 2 Roberts D M, Harmon A C. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 375~ 397
- 3 Jena P K, Redd A S A, Poovaiah B W. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant CaM: signal-induced change in the expression of CaM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 3 644~ 3 648
- 4 Breton C, Chabound A, Rochon E M, et al. PCR-generated cDNA library of transition-stage maize embryos: cloning and expression of calmodulin genes during early embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 105~ 113
- 5 Davies S P, Singh M B, Knox R B. Identification and in situ location of pollen-specific genes. *Int Rev cytol*, 1992, 140: 19~ 35
- 6 Sasaki T, Song J, Koga-ban Y, et al. Toward cataloguing all rice genes: large-scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library. *Plant J*, 1994, 6: 615~ 624
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~ 55
- 8 陈绍荣, 毕学知, 吕应堂, 等. 一种优化的植物组织 RNA 原位杂交技术. *遗传*, 1998, 3: 27~ 30
- 9 Poovaiah B W, Reddy A S N. Calcium and signal transduction in plant. *Crit Rev Plant Sci*, 1993, 12(3): 185~ 211

- 10 Means A R, Tash T S, Chafouleas T G. Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev*, 1982, 62(1): 1~ 39
- 11 Goddard R H, Wick S W, Silflow C D, et al. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1~ 6
- 12 Fisher D D, Gilroy S, Cyr R J. Evidence for opposing effects of calmodulin on cortical microtubules. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1 079~ 1 087
- 13 Knight M R, Smith S M, Trewavas A J. Wind induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4 967~ 4 972
- 14 Oh S A, Kwark J M, Kwun I C, et al. Rapid and transient induction of calmodulin encoding gene(s) of *Brassica napus* by a touch stimulus. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 586~ 590
- 15 Dauwalder M, Roux S J, Hardison L. Distribution of calmodulin in pea seedlings: immunocytochemical localization in plumules and root apices. *Planta*, 1986, 168: 461~ 470
- 16 Lin C T, Sun D, Song G X, et al. Calmodulin: localization in plant tissue. *J Histochem Cytochem*, 1986, 34: 561~ 567

(1998-02-10 收稿, 1998-05-08 收修改稿)

稀土元素对酸雨胁迫小麦抗氧化酶的生物学效应

严重玲^④ 洪业汤 杨先科^④ 付舜珍^④ 吴善绮^④

(中国科学院环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; ④贵州省环境保护科学研究所, 贵阳 550002)

摘要 利用盆栽实验, 研究了稀土元素对酸雨胁迫小麦抗氧化酶的生物学效应. 结果表明, 酸雨和稀土元素均能不同程度地影响小麦抗氧化酶活性. 酸雨胁迫使小麦抗氧化酶(CAT, SOD)活性随其 pH 值减小而呈单峰曲线, 施用稀土元素后, 抗氧化酶活性变化相对稳定, 变化曲线峰值向酸度加大的方向后移. 在酸雨酸度不大的条件下, 稀土元素明显减弱了小麦抗氧化酶对酸雨胁迫的敏感性, 增强了小麦抗酸雨的能力.

关键词 酸雨胁迫 稀土元素 小麦 抗氧化酶

活性氧等自由基能引起脂膜过氧化作用, 破坏膜及细胞的正常生理过程. 生物体内存在着一个防止自由基破坏的膜保护系统——抗氧化系统, SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)就是这个系统中的两种重要保护酶. SOD 清除 $O_2^{\cdot -}$ 而形成 H_2O_2 , CAT 则是催化 H_2O_2 形成 H_2O , 有效地阻止 $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 在体内的积累, 排除它们对细胞膜结构潜在伤害的可能性^[1]. 酸雨对作物的一些抗氧化酶的影响^[2, 3]以及稀土元素能提高作物的抗逆性^[4]已有文献报道, 但稀土元素对酸雨影响作物抗氧化酶的防护效应尚未见报道. 本文首次报道稀土元素对酸雨胁迫下小麦抗氧化酶的生物学效应.

1 材料与方法

选择我国酸雨多发区常见并对酸雨敏感的植物——小麦^[5](*Triticum aestivum*, L) 贵花一号为研究材料, 种子由遵义龙坪农推站提供; 供试稀土由河南商丘稀土微肥厂提供, 其元素

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-20-2202>