

花生胚离体发育及渗透物质的影响

林 鹿 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘 要

在无外源激素培养基上花生胚能继续发育, 渗透物质如甘露醇可抑制胚早萌, 维持胚性发育, 促进贮藏蛋白质合成和累积。渗透物质对胚离体发育的调控与其提高胚内源 ABA 含量有关。

关键词: 花生胚; 离体发育; 渗透物质; 内源 ABA

植物胚胎发育及调控的生理生化研究已成为生物工程的一个重要方面^[1]。植物激素在植物胚胎发育中起着十分突出的调控作用^[3,4]。很多资料表明, ABA 在植物胚胎发育中起着一种正向调节作用^[2,3,7]。ABA 的产生被认为与植物组织水势有密切关系^[5]。随着胚组织的发育, 其内部水势不断下降, 激发 ABA 迅速合成或从维管组织输入从而对胚发育起着十分重要的调控作用^[12]。渗透物质如甘露醇具有改变离体培养的植物组织水势的作用^[4,11]。一定浓度的渗透物质能维持细胞膨压, 直接影响 ABA 的合成^[10,14]。花生组织培养已有较多的研究, 但大多数属于幼苗诱导方面的工作^[6]。本文报道花生胚在离体培养条件下的发育状况及渗透物质对胚发育、内源 ABA 含量和贮藏蛋白质合成与累积的影响。

材料与方 法

幼胚培养 供试花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种为粤油-116, 种植于中山大学生物系试验区内。以 15、40 和 65DAP (Days after pegging, 果针入土后天数) 的胚为材料。培养基含 MS 培养基的无机成份和 B₅ 培养基的有机成份, 液体振荡培养。设四个处理: (A) 有种皮胚+8%甘露醇; (B) 有种皮胚但无甘露醇; (C) 去种皮胚+8%甘露醇; (D) 去种皮胚但无甘露醇。每一培养瓶含培养液 16ml, 3 粒胚。每一处理培养 24 瓶。有种皮胚培养液加入 1%活性炭和 1%抗坏血酸以防止种皮发生褐变。黑暗条件下培养 5、10 和 15d 时, 分别取样测定胚长度、鲜重及萌发率 (萌发以胚根突出胚 1mm 为标准), 以培养零天作对照。

内源 ABA 含量测定 按吴颂如^[5]的方法。用南京农业大学提供的 ABA 酶联免疫测试药盒测定。取培养了一定天数的胚洗净后, 加入 80%甲醇溶液在冰浴中研磨, 4℃条件下 4000rpm 离心 2 次, 每次 10min。合并上清液分别在 pH8.0 和 pH2.5 条件下用乙酸乙酯提取 3 次。样品 N₂ 吹干后经甲酯化, 取 50μl 注入药盒微量滴定板上小孔内与 50μl ABA 抗体结合, 洗涤后加入邻苯二胺显色剂于 37℃温育 30min, 再加入 50μl 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于 ME891

型酶联免疫检测仪上读数,由 ABA 标准曲线上查出样品 ABA 含量。

贮藏蛋白质含量测定 培养一定天数的胚经冰冻干燥后,弃去胚轴,子叶在冰浴中研磨成粉末,加入正己烷于-20℃过夜脱脂,按照 Bradford^[9]的方法测定盐溶蛋白质含量。脱脂粉在 10%NaCl, 1mmol/L PMSF (苯甲基磺酰氟, Serva 公司产品), 10mmol/L β-巯基乙醇 (FARCO 公司产品) 的 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.9) 中研磨匀浆, 4℃条件下提取 3h, 15000rpm 低温离心 30min, 上清液为盐溶蛋白质提取液。样品液经考马斯亮蓝 G₂₅₀ (Serva 公司产品) 染色后,在 721 型分光光度计上读数,由牛血清蛋白 (Serva 公司产品) 标准曲线上查出盐溶蛋白质含量。

结果与分析

一、内源 ABA 含量变化

不同 DAP 的花生胚在离体发育过程中的内源 ABA 含量变化是不相同的。经渗透因素处理的 15 和 40DAP 的胚在离体培养期间内源 ABA 含量不断增加, 65DAP 的胚在 0—5d 内 ABA 含量增加, 在 5—15d, 却减少了。没有渗透物质处理的 15 和 40DAP 的有种皮胚, 在离体培养期间内源 ABA 含量都呈上升趋势, 但 65DAP 的胚在此期间内源 ABA 含量是下降的。去种

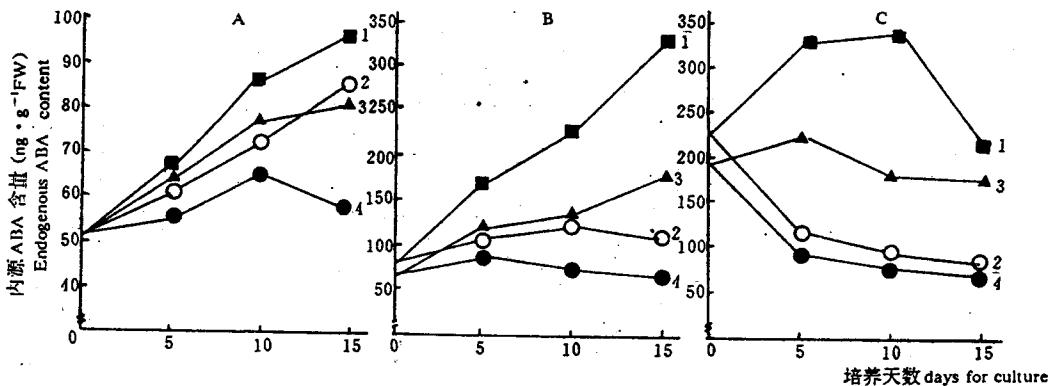


图 1 花生胚离体发育期间内源 ABA 含量变化及渗透物质的影响

Fig. 1 Changes of endogenous ABA content of in vitro peanut embryo and the effect of osmotic regulator (A. 15DAP; B. 40DAP; C. 65DAP)

1. 有种皮胚+8%甘露醇 embryos with seed coat+8% mannitol;
2. 有种皮胚但无甘露醇 embryos with seed coat but no mannitol;
3. 去种皮胚+8%甘露醇 embryos without seed coat+8% mannitol;
4. 去种皮胚但无甘露醇 embryos without seed coat but mannitol

DAP=Embryo material collected at days after pegging of the peanut

皮胚在没有渗透物质存在的条件下,只有 15DAP 的在 0—10d 内内源 ABA 含量增加。因此,渗透物质对离体发育花生胚内源 ABA 含量的影响十分显著。经渗透物质处理的 40DAP 去种皮胚,离体培养 5、10 和 15d 后,其内源 ABA 含量分别是无渗透物质处理的 1.3、1.8 和 3.5 倍。

和 15 及 40DAP 的离体发育胚相比较, 渗透物质对 65DAP 胚的影响要少得多。种皮对胚发育过程中内源 ABA 含量的变化也有一定影响, 无论任何一个发育时期, 有种皮胚的内源 ABA 含量均比去种皮胚要高。自然条件下发育的 40DAP 胚的种皮内源 ABA 含量达 $251.34\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$, 远远高于此时子叶的含量 $94.01\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 。尚不清楚子叶的内源 ABA 是由本身合成, 抑或是由胚轴及种皮输送进来, 胚轴可能是胚内源 ABA 合成的部位之一。

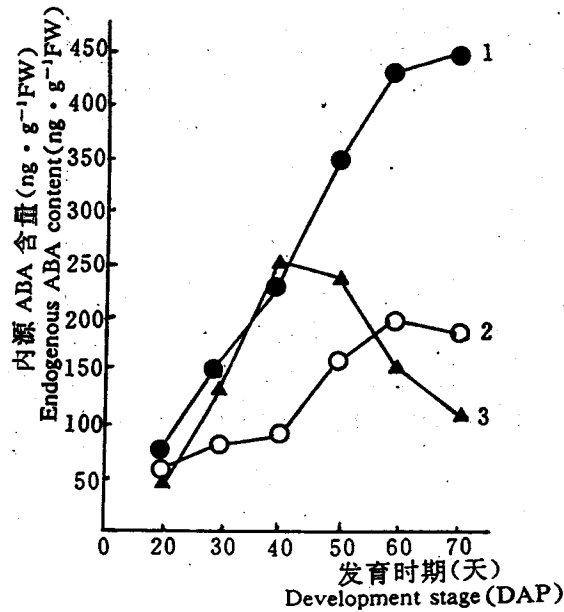


图 2 自然条件下花生胚发育过程中内源 ABA 含量的变化

Fig. 2 Changes of endogenous ABA content during the development of peanut embryo in natural environment

1. 胚轴 hypocotyl 2. 子叶 cotyledon 3. 种皮 seed coat

二、胚的生长与萌发

在离体培养过程中, 花生胚的体积与鲜重不断增加, 发育晚期胚的增长速度稍慢。15DAP 胚离体培养 15d 后, 胚长度增加了 2.25 倍, 鲜重增加了 4.1 倍, 40DAP 胚在此期间只分别增加了 1.4 和 1.5 倍。渗透物质处理的胚萌发率显著降低, 如没有甘露醇的 15 和 40DAP 胚离体培养 15d 时, 萌发率分别是 20% 和 91%, 而处理的同样胚萌发率却为零。联系到胚离体发育过程中内源 ABA 含量的变化, 渗透物质很可能是通过 ABA 对胚的萌发起调控作用, 随着胚内源 ABA 含量的降低, 胚由发育转向萌发。种皮抑制胚萌发的作用十分明显, 如没有甘露醇时离体培养 15DAP 的去种皮胚 15d 时萌发率是 20%, 而有种皮胚的萌发率却是零; 有渗透物质存在时, 65DAP 的去种皮胚离体培养 15d 后萌发率是 100%, 而此时有种皮胚的萌发率却只有 53%。

表1 花生胚离体发育期间的生长情况(去种皮胚)

Table 1 The growth of in vitro peanut embryo without seed coat

Culture days (d)	15 DAP				40 DAP				65 DAP			
	L (mm)		FW (mg)		L (mm)		FW (mg)		L (mm)		FW (mg)	
	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M
0	3.6	3.9	40	39	9.5	9.3	490	501	13.2	12.9	782	773
5	4.6	4.4	89	63	12.5	11.8	572	594	15.5	13.4	851	821
10	7.4	8.5	123	94	14.1	13.4	625	636	16.3	14.9	992	893
15	9.1	8.3	163	161	16.2	13.8	723	681	16.9	15.1	1019	948

DAP=取材时胚的发育天数

Embryo material collected at days after pegging of the peanut

L=胚长 Length of the embryo;

FW=胚鲜重 Fresh weight of the embryo;

O=无甘露醇 Without mannitol;

M=8%甘露醇 With 8% mannitol

表2 花生胚离体发育期间的萌发率(%)

Table 2 Germinating rate (%) of peanut embryo in vitro

发育阶段 Development stage (DAP)	培养时间 Culture days (d)	0				8%甘露醇 Mannitol 8%	
		去种皮胚 embryos without seed coat		有种皮胚 embryos with seed coat		去种皮胚 embryos without seed coat	有种皮胚 embryos with seed coat
		15	5	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	
	15	20	0	0	0	0	
40	5	23	0	0	0	0	
	10	63	42	0	0	0	
	15	91	64	0	0	0	
	5	84	63	20	0	0	
65	10	100	87	23	0	0	
	15	100	100	100	53		

三、贮藏蛋白质合成与累积

从图3可见,花生胚离体发育过程中,贮藏蛋白质的合成和累积不断增加,15和40DAP胚增加速度更大一些。发育中的胚在转向萌发时,贮藏蛋白质仍能合成和累积,40DAP无甘露醇处理的去种皮胚离体培养15d后,萌发率几乎是100%,而在此期间贮藏蛋白质仍增加1.2倍。从贮藏蛋白质合成和累积来看,似乎种子的发育系统和萌发系统在一定时期内是相对独立互不干扰的。渗透物质明显地促进了贮藏蛋白质的合成与累积,15DAP去种皮胚离体培养15d时,贮藏蛋白质增加了100.71%,而有8%甘露醇处理的同样胚却增加了270.62%。种皮对贮藏蛋白质合成的影响不显著。和15及40DAP胚相比较,渗透物质对65DAP胚的贮藏蛋白质合成和累积的作用减弱了。

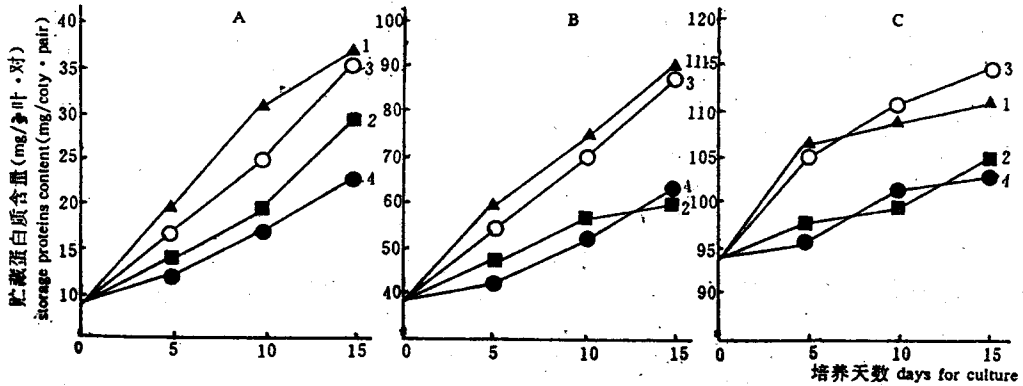


图3 花生胚离体发育期间贮藏蛋白质合成与累积及渗透物质的影响

Fig. 3 Storage proteins synthesis in *in vitro* peanut embryo during development and the effect of osmotic regulator (A. 15DAP B. 40DAP C. 65DAP)

1. 有种皮胚+8%甘露醇 embryos with seed coat+8% mannitol;
2. 有种皮胚但无甘露醇 embryos with seed coat but no mannitol;
3. 去种皮胚+8%甘露醇 embryos without seed coat +8% mannitol;
4. 去种皮胚但无甘露醇 embryos without seed coat but no mannitol;

DAP=Same as in fig. 1

讨论

Milborrow 曾报道植物叶片在水分逆境时 ABA 含量迅速上升⁽¹³⁾。Barros 观察到植物根和茎在水分胁迫时内源 ABA 水平也提高了⁽⁹⁾。Loveys 在葡萄果皮组织的悬浮培养液中加入渗透物质甘露醇时,组织内源 ABA 含量增加了 30 倍⁽¹¹⁾。Dure 报道棉花胚胎发育期间,当和珠柄组织相连的维管束坏死时,即胚珠组织出现水分胁迫情况时,内源 ABA 含量上升⁽⁹⁾。Zeevaart 认为,发育中的小麦和豌豆种子内源 ABA 含量上升也是由于种子含水量下降所致⁽¹⁴⁾。花生胚离体发育过程中有渗透物质处理时,胚内源 ABA 含量增加很多,这与上述报道一致。Jackson 认为,发育中的果树胚内源 ABA 来自种皮⁽¹⁰⁾,离体发育花生去种皮胚内源 ABA 含量明显低于有种皮胚,自然条件下正常发育的花生胚,其胚轴内源 ABA 含量明显高于子叶,表明种皮和胚轴与内源 ABA 的生物合成有密切关系。自然条件下发育晚期的花生胚内源 ABA 含量明显高于早期,离体发育的花生胚在萌发时内源 ABA 含量下降,而渗透物质由于提高了内源 ABA 含量并抑制胚的萌发,因此,ABA 很可能是抑制花生胚萌发的抑制物质之一。渗透物质可能通过改变胚组织细胞内水势梯度,启动 ABA 合成⁽³⁾。花生胚离体发育过程中,渗透物质可能是通过提高胚内源 ABA 含量来调控贮藏蛋白质的合成和累积,但也应注意到,40 和 65DAP 的花生胚离体发育过程中内源 ABA 含量趋于下降,贮藏蛋白质仍有一定的合成与累积,ABA 含量水平和贮藏蛋白质的累积量不存在平行关系,可能贮藏蛋白质基因转录的启动,只要在某一内源 ABA 含量阈值以上就能实现,也可能 ABA 从某种程度上具有维持贮藏蛋白质 mRNA 稳定性的作用,因为甘露醇处理的 65DAP 花生去种皮胚培养 10d 后,胚已经萌发,内源 ABA 含量也趋于下降,但贮藏蛋白质仍能继续合成和累积。ABA 对贮藏蛋白质合成和累积的调控机制仍有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 黄上志, 傅家瑞. 脱落酸对发育中花生胚萌发和贮藏蛋白质合成和积累的影响. 植物生理学报, 1993; 19(1): 31-37
- 2 黄上志, 傅家瑞. 花生种子的发育与贮藏蛋白质的合成和积累. 植物生理学报, 1992; 18 (2): 142-150
- 3 林鹿, 傅家瑞. 高等植物 ABA 的 C 40 合成途径及调控. 植物学通报, 1993; (排印中)
- 4 林鹿, 傅家瑞. 植物种子发育过程中脱水、ABA 和抑制早萌及贮藏蛋白质合成和积累的关系. 种子, 1993; 5: 31-34
- 5 吴颂如, 陈婉芬, 周莹. 酶联免疫法 (ELISA) 测定植物内源激素. 植物生理学通讯, 1988; 24 (5) 53-67
- 6 罗葆兴. 花生的组织培养. 花生科技, 1989; 2: 1-7
- 7 覃章铮, 唐锡华. 水稻胚和胚乳内源 ABA 含量的变化及其与发育和萌发的关系. 植物学报, 1990; 32 (6): 448-455
- 8 Barros R S, Neil S J. Periodicity of response to abscisic acid in lateral buds of willow (*Salix viminalis* L.). *Planta*, 1988; 168; 530-535
- 9 Dure L S. Seed formation. *Ann Rev Plant Physiol*, 1975; 26; 259-278
- 10 Jackson G A D. Hormonal control of fruit development, seed dormancy and germination, with particular reference to *Rosa*. *Soc Chem Ind (Lond) Monager*. 1988; 31; 127-156
- 11 Loveys B R, Milborrow B V. Metabolism of abscisic acid, in the biosynthesis and metabolism of plant hormones. Crozier A, Hillman J R eds. *Soc Exp Bio Semin Ser*, 1984; 23; 71-104
- 12 Michel B E. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol*, 1973; 51; 914-916
- 13 Milborrow B V. The stability of conjugated abscisic acid during wilting. *J Exp Bot*, 1978; 29; 1059-1066
- 14 Zeevaart J A D, Creelman R A. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1988; 39; 439-473

IN VITRO DEVELOPMENT OF PEANUT EMBRYO: EFFECT OF OSMOTIC REGULATOR

Lin Lu Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

In this paper, endogenous ABA content, growth, precocious germination, storage protein accumulation of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. Yueyou-116) embryo in vitro were examined. Four treatments in the experiment were given as follows: (A) embryo with seed coat + 8% mannitol; (B) embryo with seed coat + no mannitol; (C) embryo without seed coat + 8% mannitol; (D) embryo without seed coat + no mannitol. The results showed that the embryo of peanut could normally develop without exogenous hormones. The osmotic regulator such as mannitol inhibited precocious germination, maintained embryonic development and promoted the synthesis and accumulation of storage protein. Endogenous ABA content rose in the treatment with mannitol in vitro. The regulatory effect of mannitol on the development of embryo in vitro was probably related to the increase of endogenous ABA content in embryo tissues.

Key words: Peanut; Embryo development; Osmotic regulator; Endogenous ABA