

黄瓜子叶离体后的一些生理变化

王首锋 梁海曼 周菊华

(杭州大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要 成熟种子的子叶离体后, 在无外源激素和营养供应的滤纸保湿 ($26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 2.92 W m^2 , 14 h 光照) 条件下培养。0-4 d 内子叶的面积大小和鲜重迅速增加而干重基本保持不变, 4 d 后子叶面积和鲜重继续增加但速度减慢, 干重迅速下降; 呼吸速率和叶绿素含量 4 d 前稳定上升, 第 4 天达到峰值后下降。离体后 6 d 内, 子叶中矿质元素含量发生了一定的变化; 除 Put 含量在第 2 天有所下降外, 子叶中 Spm, Spd 和 Cad 含量均不断上升, 但上升幅度不相同, 因此, 离体并没有削弱黄瓜子叶多胺合成; GA_3 和 ABA 含量有不同程度的上升, 但 IAA 和 ZT 含量剧增, 表明离体子叶有很好的激素合成能力。离体后 2 d 内, 子叶中 DNA 含量、RNA 含量、酸溶蛋白含量均成倍增加, 此后 DNA 含量迅速下降, 酸溶蛋白含量呈波动状, RNA 含量基本保持同样水平; 0-4 d 碱溶蛋白含量不断减少, 这表明子叶离体 0-4 d 有活跃的核酸、蛋白质代谢活动。

关键词 黄瓜; 离体子叶; 生理性状

中图分类号 Q945

CHANGES OF SOME PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS IN DETACHED CUCUMBER COTYLEDONS

Wang Shoufeng Liang Haiman Zhou Juhua

(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

Abstract Excised cotyledons of mature cucumber seeds were cultured on wet filter paper without exogenous hormones and nutrients ($26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 2.92 W m^2 , 14 h day length). During 0 to 4 days after excision, the size and fresh weight of cotyledons increased rapidly, and the dry weight remained almost constant. After the 4th day of culture, the fresh weight and the area of cotyledons continued to increase, although more slowly than before, while the dry weight decreased quickly (Fig. 1). Respiration intensity and chlorophyll content of the cotyledons increased quickly before the 4th day, and reached the peak simultaneously at day 4, and then declined obviously (Fig. 2). The contents of mineral elements in detached cotyledons appeared to change within 0 to the 6th day (Table 1). With the exception of putrescine content decreasing slightly in the 2nd day of culture, all of the contents of spermine, spermidine and cadaverine in cotyledons increased steadily, but

the increment was different. Thus, polyamine synthesis in cucumber cotyledons was not generally impaired after excision (Table 2). The contents of GA_3 and ABA in cotyledons were to some extent increased, and the contents of IAA and ZT increased markedly, indicating that the detached cotyledons were capable of synthesizing the hormones during this period (Table 2). The contents of DNA, RNA and acid-soluble protein increased obviously within the first 2 days, while DNA content declined quickly, and the acid-soluble protein content fluctuated, meanwhile, RNA content remained almost unchanged. In the first 4 day, the content of alkali-soluble protein decreased continuously (Fig. 3), indicating that the detached cotyledons kept metabolic activity of nucleic acids and proteins.

Key words *Cucumis sativa*; Excised cotyledons; Physiological characteristics

用离体材料进行生理研究或组织培养试验时, 如果对材料离体时的生理性状及其近期内的变化趋势有所了解, 则对实验设计或试验结果分析都会有很好的参考价值。黄瓜离体子叶是植物组织培养和植物生理研究中常用的材料之一, 有过不少研究报告。但迄今为止未见黄瓜离体子叶的生理性状及其变化的比较系统的报告。我们正在进行的黄瓜离体子叶培养成花的研究表明, 用 5-7 d 幼苗子叶作为外植体, 在供应 KT 并照光条件下培养, 直接成花率一般在 30% - 40%^[1]。但用黄瓜 0 d 子叶(即种子子叶)直接培养只能形成营养芽, 除个别外, 一般难以形成花芽。为了寻找黄瓜 0 d 子叶很难直接成花的原因, 同时考虑到利用黄瓜离体子叶进行培养和生理研究的报告中约有 1/3 以上采用了吸胀或不吸胀的成熟种子 0 d 子叶, 本文报告 0 d 子叶离体后的生理变化。为了尽可能减少培养基营养成分的影响, 在跟踪检测子叶离体后生理变化时采用了离体子叶在滤纸上保湿培养的方法。

1 材料与方 法

子叶保湿培养 粒选饱满的杭青 2 号黄瓜 (*Cucumis sativus* L. cv. Hangqing No. 2) 种子, 剥去种皮, 在解剖镜下, 用刀片切去胚轴, 把两子叶对称分开, 立即成对置于经高压灭菌并垫有四层湿滤纸的培养皿中, 加盖, 在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 光强为 2.92 W m^{-2} , 每天照光 14 h 的条件下培养, 每天定时添加无菌水, 保持湿润状态。滤纸为双环牌 102 型, 直径 15 cm。

子叶鲜重、干重和大小(面积)的测定 取子叶测长、宽, 称鲜重后, 置于称量瓶中, 先在 120°C 下烘 15 min, 再在 80°C 下烘至恒重。每次取 40 片, 重复 4 次, 取平均值。

呼吸速率的测定 参照张志良^[2]用 SKW-2 型微量呼吸计在 26°C 下测定。

叶绿素含量的测定 参照杨善元^[3]的方法, 用岛津 UV-265 型紫外分光光度计双波长法测定。

矿质元素测定 参照孙汉文^[4]的方法, 用 WFX-1 F2 原子吸收光谱仪火焰法测定。

内源激素的提取和测定方法 内源激素的提取采用丁静等^[5]的方法。样品测试参照陆军等^[6]的方法, 用岛津 LC-4A 高效液相色谱仪测定。测试条件: 分析柱 Zorbax ODS (4.6 mm \times 250 mm), 流动相为甲醇、乙腈和水的混和液 (2:2:6 v/v, pH4.0), 流速为 1.0 ml min^{-1} , 紫外检测 ($\lambda = 254 \text{ nm}$), 外标法定量。

多胺的提取和测定方法 参照马志超等^[7]的方法, 用 Waters 201 高效液相色谱仪(带 420 荧光检测器)测定。色谱柱为 μ -Bondapak NH_2 柱(103.9 $\mu\text{m} \times 300$ mm), 用 1,6- 己二胺作内标, 流动相为甲苯: 氯仿: 三乙胺(10:89:1), 流速为 1.2 ml min^{-1} , 荧光检测 $\lambda_{\text{Ex}} = 338$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 495$ nm。

核酸和蛋白质的提取、纯化和测定 参照朱治平等^[8]的方法。

以上实验均重复 4 次。

2 结果

2.1 离体子叶在保湿条件下的鲜重、干重和面积的变化

子叶离体后在保湿条件下和一定期限内仍可生长。从图 1 可以看出: 子叶离体后保湿培养, 干重在前 4 d 无明显变化, 4 d 后逐渐下降, 8 d 时干重比 4 d 时下降 32%, 鲜重则在 8 d 内稳步上升。子叶面积在 6 d 前由于细胞吸水膨胀而成倍增大, 6 d 后则增长缓慢。这表明, 黄瓜子叶从种子离体后具有明显的细胞吸水生长能力, 其保持时间不少于 4 d。因此, 用 0 d 子叶进行生理性状变化的试验时, 以干重、鲜重或面积为基础计算的实验结果是有区别的, 其指示的意义也有所不同。以下的实验均以干重为基础计算。

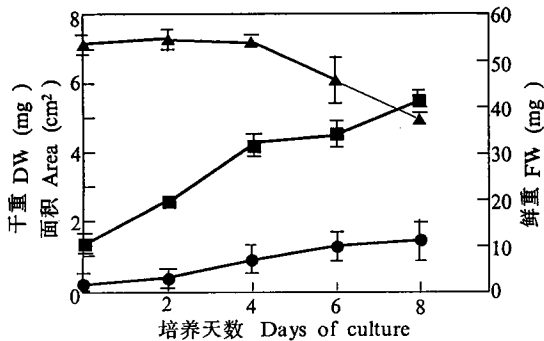


图 1 单个离体子叶在保湿培养过程中鲜重、干重和面积的变化

Fig. 1 Time course of changes in fresh and dry weights and area of a detached cucumber cotyledon cultured on wet filter paper
 —▲— DW; —■— FW; —●— Area

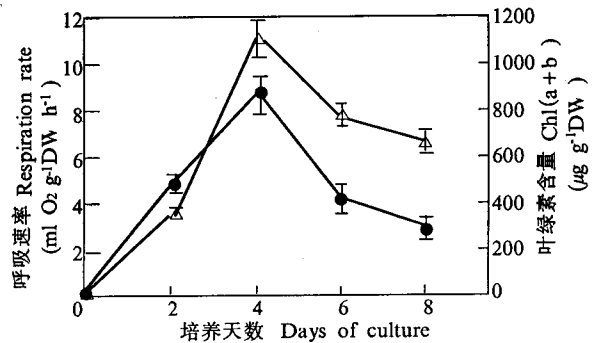


图 2 在保湿培养过程中离体子叶呼吸速率和叶绿素含量的变化

Fig. 2 Time course of changes in respiration rate and Chl content in detached cucumber cotyledons cultured on wet filter paper
 —●— Respiration; —△— Chl

2.2 子叶的呼吸速率和叶绿素合成能力

从图 2 可以看出, 子叶离体培养后呼吸速率稳步上升至第 4 天达峰值, 随后迅速下降, 第 8 天仅为第 4 天的 39%。在离体保湿培养期间, 子叶在光照条件下叶绿素含量迅速增加, 至保湿培养 4 d 时达最高值, 接着降低, 第 8 天时为第 4 天的 58%, 说明子叶离体 4 d 后叶绿素合成能力开始小于降解能力。从以上现象联系到图 1 所示干重变化, 即使扣除 4 至 8 d 的干重下降幅度, 呼吸速率和叶绿素含量也属实质性下降。看来离体 0 d 子叶保湿培养至 4 d 后, 其生理性状出现显著的变化。

2.3 子叶中的矿质元素含量变化

在分析的矿质元素中, 离体子叶保湿培养过程中含量明显增加的有 Na、Zn 和 Fe(表 1)。

保湿培养后的子叶中这些矿质元素含量的增加可能是来自水和滤纸中的杂质。但是水和滤纸中也含有不少 Ca、Cu 和 K，而培养后的子叶中未见它们明显增加，这说明在离体保湿培养期间子叶中矿质元素的含量发生了一定的变化，这种变化不完全取决于水和滤纸中杂质含量的多寡。因此，如果利用 0 d 子叶进行较长时间的生理试验，根据试验内容可能需要注意到子叶中矿质元素含量的变化和环境中杂质的影响。

2.4 子叶中蛋白质、核酸含量

从图 3B 可以看出，子叶离体后 0-2 d, DNA、RNA 含量均有成倍增加，以后 DNA 含量下降，表明种子子叶切离后进入保湿培养初期仍具有良好的核酸合成能力。子叶离体 0-4 d, 总蛋白含量急剧下降至最低点，碱溶蛋白含量下降更甚，而酸溶蛋白则

在 0-2 d 内含量反有增加，随后呈波动状，表明子叶离体初期有活跃的蛋白质代谢活动(图 3A)。因此，在用子叶进行核酸、蛋白质代谢的外源影响因子的研究时还应注意子叶离体后自身存在的核酸、蛋白质代谢变化。

表 1 离体保湿培养期间子叶中矿质元素含量的变化

Table 1 Changes in contents of mineral elements in detached cucumber cotyledons during culture on wet filter paper

矿质元素 Mineral element*	滤纸 Filter paper ($\mu\text{g}/\text{Piece}$)	双蒸水 Doubly dist. water ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	时间 Time (d)			
			0	2	4	6
K	27.3 ± 2.8	0.09 ± 0.01	8.4 ± 0.1	8.5 ± 0.1	7.4 ± 0.2	8.1 ± 0.2
Na	68.3 ± 7.2	0.12 ± 0.01	0.9 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Mg	41.5 ± 2.8	0	5.7 ± 0.1	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Ca	194.9 ± 10.8	3.90 ± 0.35	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Fe	52.3 ± 4.6	0.16 ± 0.02	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Zn	5.96 ± 0.46	0.13 ± 0.01	47.7 ± 2.0	67.4 ± 4.8	70.1 ± 6.7	69.8 ± 5.3
Mn	0.98 ± 0.07	0	49.0 ± 2.5	52.9 ± 1.1	58.0 ± 1.3	55.2 ± 2.8
Cu	13.9 ± 1.24	0.03 ± 0.00	37.4 ± 0.9	38.3 ± 3.0	38.8 ± 1.8	36.9 ± 1.1
P	2.06 ± 0.34	-	11.2 ± 0.6	11.8 ± 0.0	10.8 ± 0.8	10.3 ± 0.8

*mg g⁻¹DW for K, Na, Mg, Ca and Fe; and $\mu\text{g g}^{-1}$ cotyledon DW for Zn, Mn, Cu and P.

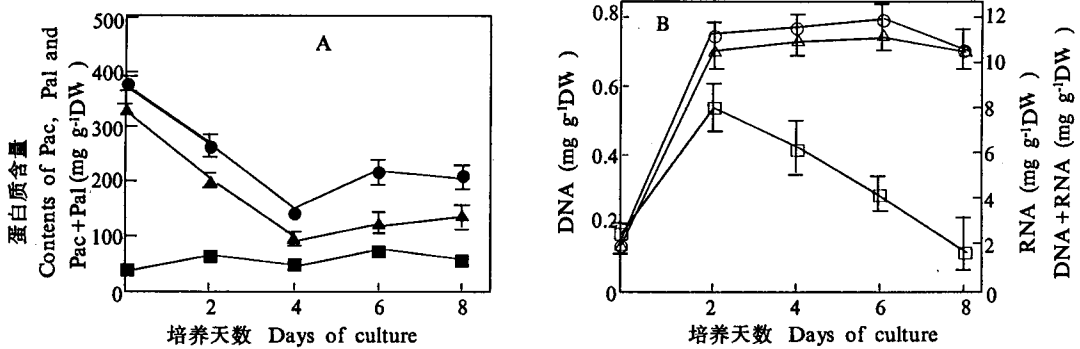


图 3 保湿培养过程中离体子叶中蛋白质(A)和核酸(B)含量的变化

Fig. 3 Changes in contents of protein (A) and nucleic acid (B) in detached cucumber cotyledons cultured on wet filter paper

—■— Pac = 酸溶性蛋白质 Acid-soluble protein; —▲— Pal = 碱溶性蛋白质 Alkali-soluble protein; —●— Pac+Pal; —□— DNA; —△— RNA; —○— DNA+RNA

2.5 子叶中的多胺含量

从表 2 可以看出，子叶在离体保湿培养期间除腐胺含量在第 2 天有所下降外，所有多胺的

含量均上升, 但上升绝对量和上升幅度各不相同。保湿培养 6 d 与培养前相比: 腐胺、尸胺、亚精胺和精胺含量分别上升了 0.693、132.29、6.63 和 5.81 倍。从而使原来含量很少的尸胺跃居诸多胺之首, 也显著改变了诸多胺间的比值。以上变化显示子叶离体后多胺的合成比较活跃, 其中腐胺含量增加较少, 而尸胺、亚精胺、精胺明显增加较多, 而且多胺的合成能保持到 4 d 以上。因此对离体 0 d 子叶进行外源多胺的添加试验时可能是难以见效。

表 2 保湿培养期间离体子叶中多胺和内源激素的含量变化

Table 2 Changes in contents of polyamines and endogenous hormones in detached cucumber cotyledons cultured on wet filter paper

培养天数 Days of culture	多胺含量 PA content (nmol g ⁻¹ DW)				激素含量 Hormone content (μg g ⁻¹ DW)			
	Spm	Spd	Cad	Put	GA ₃	ZT	IAA	ABA
0	19.9± 1.1	22.9± 1.4	5.1± 0.6	171.2± 6.4	15.2± 1.5	0.6± 0.1	0.2± 0.0	6.1± 0.8
2	64.5± 4.3	80.1± 3.3	24.9± 4.4	125.9± 8.3	33.2± 4.1	8.3± 1.1	5.7± 0.6	9.1± 1.8
4	78.1± 3.2	145.0± 7.8	163.4± 7.2	233.1± 9.8	41.2± 1.7	8.3± 0.6	5.0± 0.5	20.1± 3.9
6	135.5± 5.8	174.8± 11.3	679.8± 7.3	289.8± 9.5	67.3± 0.8	11.5± 0.6	13.4± 2.2	19.1± 2.7

PA:多胺 Polyamine; Spd:亚精胺 Spermidine; Spm:精胺 Spermimine; Put:腐胺 Putrescine; Cad:尸胺 Cadaverine

2.6 子叶中的内源激素状况

从表 2 可以看出, 种子中子叶刚离体时的 GA₃ 和 ABA 含量较细胞分裂素 (IAA) 和生长素 (ZT) 高。子叶离体保湿培养后, GA₃ 和 ABA 含量有不同程度的上升, 但 IAA 和 ZT 含量剧增。表明子叶在离体保湿培养期间游离内源激素含量水平有明显提高。但是, 不同激素的增幅差异较大, 相比 IAA 增加最多 (67 倍), ZT 次之 (25 倍), GA₃ (4.4 倍) 和 ABA (3.1 倍) 相对较少, 这是在用子叶进行激素试验和培养试验时应该予以注意的。

3 讨论

从本实验可以看出黄瓜成熟种子的子叶离体后有如下特点: 1. 0 d 时生长素和细胞分裂素的含量很低, 亚精胺、精胺的含量也很低。2. 子叶离体后, 一旦吸水, 子叶的呼吸和各种合成活动十分活跃, 如在 2 d 内亚精胺、精胺、IAA、ZT 的含量可分别提高 3.5、3.2、28.5 和 18.0 倍。这些表明, 既可以用黄瓜成熟种子的 0 d 子叶进行需要内源生长素、细胞分裂素等含量很低的试验, 也可以通过适当的吸胀或保湿培养等措施调整子叶的内源激素状况以利于试验的进行。黄瓜子叶可用于细胞分裂素的生物鉴定而有较高的灵敏度^[9], 这与黄瓜成熟种子子叶中内源细胞分裂素水平很低相关。黄瓜成熟种子子叶离体培养时, 进行较长时间的浸种^[10]或在供应 6-BA 条件下预培养 4 d 后再切取子叶^[11], 这些培养前的预处理可能是起了提高子叶中 IAA、细胞分裂素、多胺等含量水平以利于培养效率的作用。3. 黄瓜种子子叶离体后, 即使在无外源营养供应条件下一般也能保持较旺盛代谢活动达 4 d 或 4 d 以上。因此, 利用黄瓜子叶试验时的最适状态是离体 0-4 d 或 2-4 d。以上实验结果和实验操作都是基于材料的特点。因此, 了解黄瓜成熟种子子叶离体后的一些特点对于用子叶作实验材料的研究是有很好的参考价值的。

有关种子吸胀生理影响的报告表明: 吸胀导致渗漏增强的持续时间大约为几小时, 如燕麦

为2 h^[12]。呼吸速率在吸胀开始时即急剧上升,如花椰菜在0-2 h^[13]。水稻种子吸胀30 min即有蛋白质合成,7-8 h开始有RNA转录,12 h DNA合成开始启动^[14],24 h多胺含量提高一倍^[15]。以上事实提示,吸胀所引发的渗漏增强、呼吸加强、核酸蛋白质合成、多胺合成等大多发生在吸胀24 h内。因此,黄瓜种子子叶离体后发生的各种生理变化部分可能是子叶离体后吸胀所引起的一些生理反应。

再从子叶离体后的生理变化角度看,创伤导致的生理变化通常发生在创伤后的48 h内。如枣果薄片的伤呼吸峰值出现在创伤后12 h^[16]; *Pinus radiata* 种子子叶离体后, RNA合成的峰值出现在第1天^[17], 亚精胺合成的峰值出现在第5天^[18]; 西瓜子叶刚离体时细胞分裂素含量近乎零,在0-5 d保温培养期间含量呈直线上升^[19]。和上述创伤后的生理变化相比较,虽然材料不同,但是子叶离体后的生理变化与黄瓜0 d子叶离体后的一些生理变化相似。黄瓜0 d子叶离体后的生理生化变化多数与离体创伤有关,少数则不一定是创伤影响的反映,可能是子叶与胚轴相分离后的生理反应,这一点还有待进一步研究证实。

综上所述,本文研究结果提示:1. 子叶离体初期自身的生理状况会有显著变化。当利用子叶进行短期生理试验或以子叶为外植体进行培养试验时,这些变化对试验会有较大的影响。因此,应该重视材料的筛选和子叶离体前必要的性状调控。2. 子叶离体后出现的生理性状变化包含有切离创伤和吸胀所引起的一些生理反应,也可能有子叶和胚轴相分离引起的生理反应,这些是在预计子叶离体后的生理变化和设计必要的性状调控试验时需要予以注意的。

参考文献

- 1 梁海曼. 黄瓜离体子叶培养物直接分化花芽的研究. 中国学术期刊文摘, 1995, (增刊): 97
- 2 张志良. 植物生理学实验指导(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990, 279-288
- 3 杨善元. 关于测定叶绿素含量及a·b值等问题. 植物生理学通讯, 1983, (4): 61
- 4 孙汉文. 原子吸收光谱分析技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 342-343
- 5 丁静, 沈镇德, 方亦雄等. 植物内源激素的提取分离及生物鉴定. 植物生理学通讯, 1979, (2): 27
- 6 陆军, 傅远志, 符梅忠等. 水杉在花芽分化期内源激素含量的变化. 植物生理学通讯, 1993, 29(1): 20-22
- 7 马志超, 藏荣春, 储可铭等. 高效液相色谱法测定蕃茄愈伤组织中的多胺. 分析化学, 1991, 19(11): 1317-1319
- 8 朱治平, 沈瑞娟, 唐锡华. 高等植物胚胎的发育生物学研究. 植物生理学报, 1980, 6(2): 141-147
- 9 Fletcher R A, McCullagh D. Cytokinin-induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons. *Planta*, 1971, 101(1): 88-90
- 10 汤朝起, 王琦等. 黄瓜子叶和下胚轴组培中的全息现象. 细胞生物学杂志, 1995, 增刊 I: 77
- 11 Shetty K, Shetty G, Ezura H et al. Stimulation of benzyladenine-induced *in vitro* shoot organogenesis from cotyledons of *Cucumis sativus* L. by proline and abscisic acid. *Plant Tissue Cult Lett*, 1992, 9(2): 104-108
- 12 Haggquist T M-L, Pettersson A, Liljenberg C. Growth inhibitors in oat grains. I. Leakage of inhibiting factors from oat grains during imbibition and the effect of these on germination and growth. *Physiol Plant*, 1984, 61: 75
- 13 Lunn G, Madsen E. ATP-levels of germinating seeds in relation to vigor. *Physiol Plant*, 1981, 53: 164
- 14 张兴海, 唐锡华. 水稻吸胀时大分子合成的顺序化. 植物生理学报, 1986, 12: 58
- 15 Mukhopadhyay A, Ghosh B. Polyamine metabolism in relation to viability of rice seeds. *Seed Sci Technol*,

- 1986, 14:737
- 16 Lu G H, Li C J, Lu Z S. Wound-induced respiration in thin slice of jujube fruit. *J Plant Physiol*, 1993, 141:115
 - 17 Villalobos V M, Oliver M J, Yeung E C et al. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultured *in vitro*. *Physiol Plant*, 1984, 61:483
 - 18 Biondi S, Torrigiani P, Sansorini A et al. Inhibition of polyamine biosynthesis by dicyclohexylamine in cultured cotyledons of *Pinus radiata*. *Physiol Plant*, 1988, 72:471
 - 19 Rossi G, Morziani G P, Uneddu P et al. Changes in endogenous levels of three cytokinins during development of excised watermelon cotyledons. *Physiol Plant*, 1991, 83:647