

大麦种子前期处理对其外植体性状的 调控和对其机制的探讨(I)

邵宏波¹, 梁海曼²

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 浙江大学生命科学院, 浙江杭州 310012)

摘要: 研究了种壳对大麦种子吸胀生理影响的调节作用, 同时对其外植体性状的调控作用及其机制也进行了探讨。结果如下: (1) 种壳显著延缓种子的吸水进程; (2) 种壳对分子渗漏影响显著; (3) 总 N 的渗漏主要来自胚乳, Mn^{++} 的渗漏在胚中相对较多, 种壳对 K^+ 渗漏影响较大; (4) 去壳促进吸胀期间的可溶性蛋白量和过氧化物酶同工酶活性上升; (5) 吸胀使 IAA、 GA_3 含量上升, 使胚乳中的 ABA 含量显著减少, 去壳显著促进吸胀初期胚乳中的 ABA、IAA、 GA_3 含量上升, 去壳减少吸胀后期胚中的 IAA、ABA、 GA_3 含量; (6) 去壳减少吸胀 24 h 并且种子进行培养时的培养效果, 它们具有明显较高的萌发率和愈伤组织诱导率。

关键词: 大麦种子; 前期处理; 吸胀; 种壳; 渗漏; 矿质元素; 内源激素; 愈伤组织

中图分类号: Q945.6+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)04-0347-06

The regulation of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed pretreatment on its explant characters and a study on its mechanism(I)

SHAO Hong-bo¹, LIANG Hai-man²

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and The Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: In this paper, we study on the regulative effects of hull on the physiological influence of imbibition on barley seeds. The results are as follows: (1) The hull retarded the water absorption of seeds Obviously. (2) The hull affected the leakage of molecules. (3) The N (in the form of NH_4^+ , NO_3^- etc.) leaked mainly from the endosperms, and the Mn^{++} leaked more from the embryos, the hull limited the k^+ leakage. (4) The content of soluble proteins and the activities of isoperoxidases raised during imbibition since the hulls were hulled. (5) The levels of IAA and GA_3 increased, and the level of ABA lowered in the endosperms during imbibition. If the hulls were hulled, the levels of ABA, IAA and GA_3 rose obviously in the endosperms during the early stage of imbibition, and the levels of IAA, ABA, and GA_3 lowered during the late stage of imbibition. (6) The percentages of germination and callusing were higher than those of the seeds soaked after the hulls were husked, when the inoc-

收稿日期: 2000-10-17

作者简介: 邵宏波(1964-), 男, 吉林四平人, 理学硕士, 副教授, 国际有性植物繁殖研究学会(ISPRRA)会员, 广西大学兼职教授与硕士研究生导师, 从事植物生物技术及植物分子生物学的研究工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 39810800); 中国科学院广西植物研究所科研启动经费资助。

ulates were seeds and not embryos.

Key words: barley seeds; pretreatment; imbibition; hull; leakage; mineral elements; internal hormones; callus

大麦(*Hordeum vulgare* L.)是人类最古老的谷类作物之一^[1],其产量居世界谷类产量第四位^[2]。目前世界上仍有多于四分之一的人口以大麦为主食^[2,3]。随着啤酒工业和畜牧业的发展,对大麦的产量和品质要求不断提高。近 10 a 来以大麦为材料的研究正在不断深入,并将生物工程技术引入大麦育种研究也日益受到重视^[4-7]。目前针对大麦新技术育种的花药培养,胚乳培养、幼胚培养的报告很多,但由于这些材料受到季节的限制,在应用上局限性又大,因而成熟胚的培养越来越受到注意^[1,2,8-11]。然而以种子为材料获取的成熟培养的器官再生率很低,而且由于基因型和供体植株生长环境的不同及培养成分和条件的复杂性,使得前人的工作不易重复^[9]。因而要使大麦种子及其成熟胚培养成为可用于大麦生物技术研究及大麦新技术育种的实验系统,就有必要对此进行系统的基础研究以控制大麦种子的外植体性状^[11-13]。

麦类种子播种前进行浸种处理一般不利于种子萌发。我们的实验表明用 30% PEG 6 000 浸种,而且只浸种 3 h 会有利于大麦种子萌发^[14-16]。有报告显示燕麦籽粒浸种时有生长抑制因素来自于种壳^[6],也有报告水稻种壳具有抗氧化活性^[14],而种皮的显著作用之一是延缓水分进入种子^[13,15-16],这有利于种子的健康萌发。为进一步了解浸种吸胀对大麦籽粒的生理影响以及种壳在吸胀中对大麦种子外植体性状的调节作用进行了如下实验。考虑到种子吸胀生理的研究比较集中于溶质渗漏和对大分子合成的影响,因而本文研究的重点是吸胀期间胚和胚乳中矿质元素、内源激素的含量变化,及种壳对这些变化的调节作用。实验结果表明:浸种吸胀使矿质元素大多净外流,使 IAA、GA₃ 含量上升,使 ABA 含量下降。去壳使吸水增强,促进分子渗漏,促进 K⁺ 外流,促进胚乳中 ABA 含量剧升。吸胀生理和种壳影响是非常复杂的^[15]。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为普通大麦(*Hordeum vulgare* L.),

其品种为早熟 3 号的成熟种子。

1.2 实验设计

种子剥去种壳后分别在 26±1 °C 下双蒸水浸种 2 h,再 30% PEG 6 000 浸种 3 h,再继续双蒸水浸种 19 h,不去壳和去壳种子分别共浸种 24 h。在分段浸种的同时,在浸种 2 h 和 24 h 后,分别取样,进行种子溶质渗漏,胚和胚乳中的矿质元素及内源激素含量等的测定及种子和胚培养试验。另外以未浸种的干种子作为测试的总对照。比较去壳和不去壳条件下浸种吸胀对于胚和胚乳以及种子和胚培养反应的影响。

1.3 检测方法

溶质渗漏测定时固定种子粒数,矿质元素分析以原子吸收分光光谱方法并且这些分析以胚、胚乳个数为单位取样并计算。

溶质渗漏的测定,分别取 20 粒种子浸入 20 mL 无离子水中,0.5 h 后用 DDS-11A 型电导仪测电介质渗漏,用岛津 UV-265 型紫外可见光分光光度仪测 O. D. 268 nm 值以代表大分子等分子渗漏。测定重复 3 次,结果基本一致,取其平均值。

蛋白质含量利用微量凯氏定氮法。测定重复 3 次,结果基本一致,取其平均值。

可溶性蛋白和过氧化物酶同工酶的凝胶电泳分析参照方国伟、梁海曼方法^[15],显色后用岛津 CS-930 型双波长色谱扫描仪记录。

内源激素测定参照丁静、沈镇德的方法^[17]。每份样品为 50 个胚或 60 个胚乳。标样:IAA 为上海化学试剂采购站进口分装,GA₃ 为上海生物化学试剂商店经销(>99.9%),ABA 为 Serva 公司产品。检测仪器为岛津 LC-6A 型液相色谱仪。SPD-6AV 型紫外可见分光光度检测仪,C-R3A 型色谱数据处理机和 7125 型固定进样阀(20 μL,美国制造)。测定条件:流动相为甲醇(含 1%醋酸):水=0.45:0.55,流速为 1 mL/min,Shim-pack ODS 柱(6 mm·150 mm),柱温 25 °C,波长 254 nm。在上述条件下同步测定内源激素。测定重复 3 次,结果基本一致,取其平均值。

1.4 培养基和培养条件

种子培养和胚培养所用培养基相同。即 N₆ 基

本培养+肌醇 100 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L-琼脂 8 000 mg/L,pH5.8。每一处理接种种子或胚 60 个。26 °C,光强 1 400 lx,每天光照 14 h 条件下培养。至少重复实验 2 次,结果基本一致,取其平均值。

2 实验结果

2.1 种壳对种子吸水的影响

从图 1 可以看出:(1)剥去种壳使种子吸水大大加快,比不去壳种子早 4 h 达到吸水饱和。(2)浸种吸水时间相同的和不去壳种子的吸水量明显不同,这在分析其它检测项目结果时需要予以注意的。

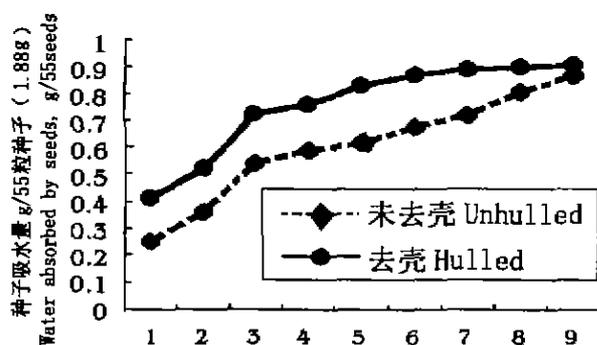


图 1 去壳和不去壳种子吸水动态

Fig. 1 Comparison of the time course of water absorption between the husked and unhusked seeds

2.2 种壳对吸胀中电解质、大分子渗漏的影响

取吸胀 2 h 和 24 h 的种子进行电解质、大分子渗漏强度检测。结果显示:(1)溶质渗漏随吸胀时间延长而减少,其中电解质渗漏的减少远甚于 O. D. 268 渗漏物的下降。(2)去壳对电解质渗漏的影响明显小于对 O. D. 268 渗漏物渗漏的影响。这暗示去壳将相对增加蛋白质、核酸等大分子物质的渗漏。

2.3 种壳对吸胀种子矿质元素含量的影响

为了解浸种吸胀过程中壳对矿质流失的影响以及胚和胚乳的矿质渗漏是否有区别,分别对去壳和不去壳种子的胚和胚乳进行了浸种前后和不同浸种时间的矿质元素分析。结果显示(表 1):(1)从胚+胚乳所含矿质元素总量看,吸胀期间中矿质元素均有净流出。其中总 N 在 36%~40%,K⁺ 在 17%~60%,Mn⁺⁺ 在 10%~34%,Mg⁺⁺ 流失较少,最多为 100%的净流出。因而,不同种类矿质元素的流失量不同。(2)剥去种壳明显增加 K 的净流出,对 N、Mg、Mn,则影响较小。因此,作为外流屏障,种壳对于不同矿质元素的作用不同。(3)将胚与胚乳进行比较可以看出:N 主要是胚乳部分净流出,胚的总 N 量在吸胀期间反有增加,这表明有 N 由胚乳向胚转移。剥去种壳对胚部分 N、K 含量的影响大于对胚乳部分的影响,Mg、Mn 则反之。因此,胚和胚乳部分的渗漏规律是不相同的。

表 1 吸胀过程中胚和胚乳矿质元素含量的变化(μg/胚或 μg/胚+胚乳)

Table 1 Changes of the contents of mineral elements in embryos and endosperms during imbibition(μg/embryo or embryo+endosperm)

吸胀时间 Time of imbibition (h)	种壳 Hull	总 N			K ⁺			Mg ⁺⁺			Mn ⁺⁺		
		胚 Embryo	胚乳 Endo-sperm	胚+胚乳 Embryo+endosperm	胚 Embryo	胚乳 Endo-sperm	胚+胚乳 Embryo+endosperm	胚 Embryo	胚乳 Endo-sperm	胚+胚乳 Embryo+endosperm	胚 Embryo	胚乳 Endo-sperm	胚+胚乳 Embryo+endosperm
0	未去壳 Unhulled	3.74	536.25	539.99	22.34	148.83	171.17	7.40	43.55	50.95	0.25	0.531	0.781
2	未去壳 Unhulled	8.46	512.51	520.97	21.60	148.01	169.61	6.61	47.85	54.46	0.235	0.593	0.828
2	去壳 Hulled	5.10	441.38	446.48	16.30	122.94	139.24	6.84	42.90	49.74	0.176	0.478	0.654
24	未去壳 Unhulled	21.30	322.02	343.32	19.16	121.75	140.91	6.74	44.42	51.26	0.174	0.531	0.797
24	去壳 Hulled	13.52	312.70	326.22	8.51	58.95	67.46	6.45	39.19	45.64	0.152	0.365	0.517

2.4 种壳对吸胀种子蛋白质含量的影响

通过对吸胀期间胚与胚乳中蛋白质含量的分析测定表明:(1)种子吸胀期间,胚乳中的蛋白质含量下降;而胚中的蛋白质含量上升。(2)吸胀 2 h 后

的胚+胚乳的蛋白质总量和未经吸胀的干种子的相近,吸胀 24 h 后,胚中蛋白质含量的增加明显多于胚乳中的减少。这些事实提示吸胀 24 h 时,胚中蛋白质的增加主要来自胚自身活跃的蛋白质合成。

(3)去壳明显降低胚和胚乳中的蛋白质含量。联系前面的渗漏结果可见去壳促进大分子渗漏,去壳使蛋白质含量下降的原因,除了去壳可能影响蛋白质合成外,可能还和去壳促进蛋白质流失有关(本结果中的胚与胚乳蛋白质含量变化图,由于篇幅关系略去,将另文发表。)

2.5 种壳对吸胀种子可溶性蛋白和过氧化物酶同工酶的凝胶电泳分析

对种子可溶性蛋白的凝胶电泳分析表明在未去壳种子中,随浸种时间延长,可溶性蛋白含量增

加而且出现一些新的谱带,这和前面胚+胚乳中蛋白质含量增加是一致的。去壳种子的表现则不同,浸种 24 h 种子中的可溶性蛋白的含量还少于浸种 2 h 的,这和本结果的图示相一致(可溶性蛋白凝胶电泳图谱变化图略,另文发表)。看来去壳种子可溶性蛋白含量下降和去壳使浸种期间可溶性蛋白净流失有关。

对种子过氧化物酶同工酶的凝胶电泳分析表明(图略,另文发表)未去壳种子吸胀 2 h 时过氧化物酶同工酶谱仅略有变化,吸胀 24 h 时过氧化物酶

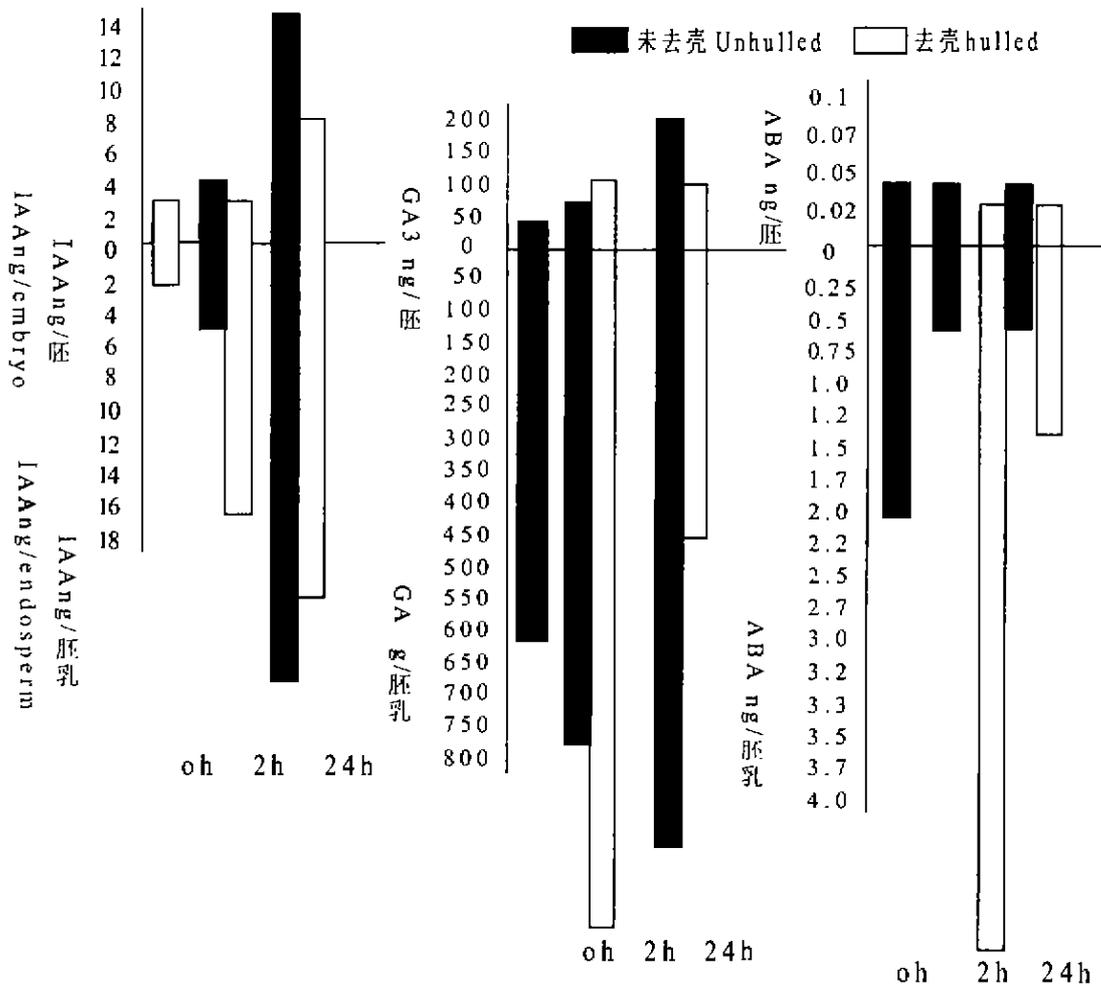


图 2 吸胀过程中胚和胚乳中 IAA、GA、ABA 含量变化

Fig. 2 Changes of the contents of IAA, GA, and ABA in embryos and endosperms during imbibition

同工酶才有显著增强。去壳种子和未去壳种子相比,吸胀 24 h 即有明显变化,不仅过氧化物酶同工酶的活性增强而且谱带数目也明显增多,这和可溶性蛋白谱的表现很不相同。联系图 1 所显示吸胀 2 h 时未去壳和去壳种子的含水量显著不同,二者的差

异可能正好反映了过氧化物酶活性对含水量比较敏感。

2.6 种壳对吸胀种子内源激素含量的影响

分析结果(图 2)显示:(1)吸胀期间,IAA 含量在胚和胚乳中均有明显变化,GA₃ 含量的相对变化

主要发生在胚部, ABA 含量的变化基本发生在胚乳。(2)对未去壳种子, 吸胀使胚中 IAA 含量迅速上升, 胚乳中 IAA 含量上升则稍迟。吸胀期间胚乳中的 ABA 含量则明显下降。(3)去壳使胚乳中 ABA、IAA 含量剧增, GA₃ 含量也有明显增加。去壳使胚中的 IAA、ABA、GA₃ 含量大多明显减少。(4)去壳使吸胀期间内源激素水平变化比未去壳的提前发生。

综上所述, 吸胀对内源激素含量的影响十分显著, 而种壳的影响更是引人注目, 需要给予更多的注意。

表 2 不同吸胀种子(胚)外植体的培养表现
Table 2 The culture response to the seeds(embryos) with different duration of imbibition

浸种时间 Duration of imbibition(h)	种壳 Hull	培养物 Cultures	萌芽(%) Bud ger- mination	出根(%) Root em- ergence	愈伤组织 Callusing (%)
2	未去壳 Unhulled	种子 Seeds	20	15	5
		胚 Embryos	31	0	17
2	去壳 Hulled	种子 Seeds	28	21	30
		胚 Embryos	10	0	4
24	未去壳 Unhulled	种子 Seeds	20	16	6
		胚 Embryos	21	0	34
24	去壳 Hulled	种子 Seeds	58	45	39
		胚 Embryos	7	0	29

2.7 去壳吸胀种子(胚)的外植体培养表现

表 2 结果显示, (1)种子培养时, 无论萌芽、出根或愈伤组织形成, 均以种子吸胀时已去壳的明显优于不去壳的; 胚培养时则反之。(2)胚培养时, 不论去壳与否, 吸胀时间长短均不能形成根。(3)在本实验范围内, 以种子去壳吸胀 24 h 时并且种子培养的具有明显较高的萌发率和愈伤组织诱导率。上述事实表明浸种、去壳与否, 特别是去壳, 对种子萌发和愈伤组织诱导的影响是十分显著的。

3 讨 论

关于种子吸胀生理影响已有较多报告, 诸如吸胀时种皮延缓吸水^[15], 吸胀时有溶质渗漏^[15], 吸胀初期有蛋白质合成^[13, 16], 吸胀后会出现新的过氧化

物酶同功酶^[3, 14], 吸胀使 IAA 水平上升^[3, 15]等。上述情况在本文测试结果中都有所反映, 这从一个侧面表明本文的实验结果是符合常规概念的。但是以往的研究很少涉及种壳在吸胀中的生理影响, 也没有学者将胚和胚乳分别进行测试, 而这两方面内容将是本文所能提供的新内容。

有关禾谷类种子前期处理并结合种壳生理作用来探讨外植体性状调节及其机理方面的研究目前只有 2 篇报告^[13, 16]。本研究果表明: 大麦种壳具有延缓种子吸水进程, 限制大分子和某些矿质元素(k⁺)的渗漏, 影响胚乳 ABA、IAA、GA₃ 含量上升和有利于胚 IAA、ABA 含量上升等作用。离体培养结果显示胚培养前以不去壳吸胀为好, 这可以从不去壳吸胀使胚具有较高的矿质元素、蛋白质、IAA、GA₃ 含量推测其原因, 但是也不能排除种壳还有其它复杂的影响。因此, 种壳并不是一种简单的屏障, 具有选择透性, 还具有其它复杂作用。本文除了在浸种吸胀和种壳作用的理论探讨方面提供了一些新线索外, 在实验室育苗、外植体性状调节等方面也提供了一定的理论基础, 对于促进我国禾谷类作物的生物工程育种工作有较大的指导意义。相关的系列研究工作将陆续发表。

中国科学院上海植物生理研究所的吴少伯研究员在内源激素测定方面给予了很大帮助, 南京农业大学周燮教授审阅全文并提出修改意见, 在此一并致谢!

参考文献:

- [1] 邵宏波, 初立业. 植物细胞转化的研究[J]. 生物学杂志, 1996, 2: 1-5.
- [2] Luhrs R, Lorz H. The establishment of Barley Embryogenic Callus and Plant Regeneration[J]. *Planta*, 1988, 175: 71-81.
- [3] 邵宏波. 分子生物学发展前沿与展望[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1993. 267-371.
- [4] 梁海曼. 花药培养学术讨论会文集[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 50-58.
- [5] 梁海曼. 植物组织培养中的 pH 值[J]. 植物生理学通讯, 1987, 3: 1-6.
- [6] 邵宏波, 梁海曼. 中国植物学会六十五周年年会学术报告及论文摘要汇编[C]. 北京: 中国林业出版社, 1998. 368-369.

- [7] 邵宏波, 初立业. 植物人工种子研究进展[J]. 广西植物, 1990, 10(2): 168—174.
- [8] 方国伟, 梁海曼. 水稻花药培养及植株再生[J]. 植物生理学报, 1985, 11(4): 366—380.
- [9] 邵宏波. 禾本科植物的组织培养研究及其应用[J]. 广西植物, 1992, 2(1): 41—58.
- [10] 邵宏波, 初立业. 离体植物花芽和花器官的发育研究进展[J]. 广西植物, 1993, 13(3): 275—288.
- [11] 李金亭, 朱命炜, 魏明开, 等. 离子注入对萝卜过氧化物酶淀粉酶和蛋白酶同工酶的影响[J]. 广西植物, 2000, 20(2): 172—176.
- [12] 魏 琴, 曹有龙, 陈 放, 等. 枸杞髓组织培养中体细胞胚胎发生与过氧化物酶同工酶分析[J]. 广西植物, 2000, 20(2): 168—171.
- [13] Mc Donald M R, *et al.* Change of Biological macromolecules during seed germination [J]. *Crop Sci.* 1998, 28: 987—992.
- [14] Woodstock L W, *et al.* Some Changes of Peroxidases and Endogenous Hormones seed Germination of Barley [J]. *Physiol. Plant*, 1981, 51: 133—139.
- [15] Tillberg E, *et al.* 13 th Confer. Plant Growth Substances[M]. 1988. 67—68, Canada.
- [16] Morohashi E. *et al.* The Culture of Barley Mature Embryos and its seed Imbibition[J]. *Plant Physiol.*, 1989, 91: 253—258.
- [17] 丁 静, 沈镇德. 植物内源激素的变化与大麦成熟胚培养[J]. 植物生理学报, 1985, 11(3): 249—259.
- [18] Kranz E, Lorz H. In vitro fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants[J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 739—746.