

梗稻蒲晚一号体胚发生中的几种生理生化变化

李中奎 刘成运 权明清

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS IN RICE (ORYZA SATIVA L. CV. PUWANYIHAO)

Li Zhongkui, Liu Chengyun, Quan Mingqing

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)

关键词 水稻蒲晚一号; 体胚发生; 蛋白质; 同功酶

Key words Rice (*Oryza sativa* L. cv. Puwanyihao); Somatic embryogenesis; Protein isozyme

目前在众多的植物组织培养中已证实, 生理生化变化可以反映出愈伤组织的生长、增殖和分化, 并且一些同功酶可以作为组织培养的一个生理生化指标^[1]。水稻的组织培养已取得了很大进展, 植株再生、体胚发生以及原生质体植株再生都已实现^[2-4], 其生理生化方面也有报道^[5,6]。本文介绍的是水稻胚性及非胚性愈伤组织的生理生化差异及体胚发生中的生理生化变化。

1 材料与方法

梗稻蒲晚一号种子去壳后用0.01% HgCl₂灭菌7—8分钟, 无菌水冲洗3次后接种到N₆附加2,4-D 2mg/l, 6-BA 4mg/l, NAA 2mg/l培养基上, 待愈伤组织长到3—6mm时切下(大约培养后20天), 继代培养基为N₆附加2,4-D 1mg/l和甘露醇10g/l。从继代第一次的培养物中挑选胚性及非胚性愈伤组织做测试。分化培养基为MS附加KT 2mg/l, NAA 0.5mg/l或无激素。愈伤组织诱导及继代在黑暗中进行, 分化时光照8—10小时/天, 光强度2000lx, 每月继代一次。

可溶性糖测定用蒽酮试剂法^[7], 用葡萄糖同法测定作标准曲线。重复3次取平均值。

可溶性蛋白质测定, 取新鲜材料1.5克研磨, 依次用蒸馏水、10% NaCl、70%乙醇和0.1% NaOH提取, 同时取材置于远红外烘干箱内(40℃)烘干, 以计算干重和鲜重的比例。用双缩脲法在721分光光度计上于540nm处测定光密度。取牛血清蛋白标准品同法测定作标准曲线。将待测数值与标准曲线相比较得出数值, 重复3次取平均值。

同功酶采用聚丙烯酰胺法, 浓缩胶3%, 分离胶7%。Tris-甘氨酸电极缓冲液。样品用电极缓冲液提取, 4000转/分20分钟后取上清液。点样: 20μl/管, 3管重复, 稳压20伏/管, 低温

$<10^{\circ}\text{C}$ 。电泳时间为3小时30分钟左右。酯酶同功酶用固兰染色法,过氧化物酶同功酶用联苯胺染色法。照相,绘图。

2 实验结果

2.1 可溶性蛋白质及可溶性总糖含量的变化

表1的数据表明,胚性愈伤组织中水溶性及盐溶性蛋白含量要比非胚性愈伤组织中的高,胚性愈伤组织继代10次(10个月)后其含量下降。醇溶性及碱溶性蛋白则相反,在继代时会比胚性愈伤组织的含量高,但变化幅度不大,比非胚性愈伤组织低。从总的可溶性蛋白含量来看,胚性比非胚性愈伤组织要高,说明前者的代谢活性比后者更强烈。这在可溶性总糖含量上也可以看出来,在胚性愈伤组织中其可溶性总糖量($414.0\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重)远远超过非胚性愈伤组织($228.0\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重),即使继代10次其含量也大大高于后者($325.0\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重),这反映出胚性愈伤组织为其后来的胚胎发生发育所做的物质上的准备。

表1 胚性愈伤组织,非胚性愈伤组织及在甘露醇中继代10次的愈伤组织可溶性蛋白质的比较($\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重)

Table 1 Comparison of soluble proteins among embryonic callus non-embryonic callus and callus subcultured in mannitol for 10 times($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight)

项目 Item	胚性愈伤组织 Embryonic callus	非胚性愈伤组织 Non-embryonic callus	继代10次愈伤组织 Callus subcultured 10 times
水溶性蛋白	136.3	94.5	115.3
盐溶性蛋白	30.0	17.6	24.5
醇溶性蛋白	10.6	14.4	10.9
碱溶性蛋白	13.2	14.4	13.6

在胚胎发生过程中,糖及蛋白质均发生了变化。发育初期,可溶性总糖量呈下降趋势,这可能是发育初期各种代谢活动增强,需要糖为其提供更多能量的缘故。但后来,约在第9天时又有一个回升期,其后便下降很快。可溶性蛋白质的变化比较复杂,水溶性及盐溶性蛋白在发育初期均呈上升势头,约在第6天时达到高峰,之后下降。碱溶性及醇溶性蛋白在胚胎发生进程中变化不大,但到后来就不能准确测量了。这样看来,在胚性发育的第6天是一个关键时期,此时在切片上可见大多数胚胎发生处于球形期(见图1)。

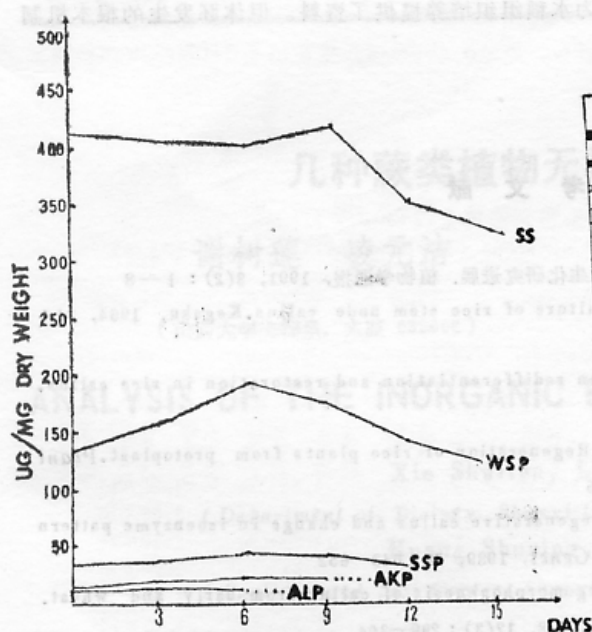
2.2 同功酶谱变化

酯酶(EC.1, 11, 1, 7)与过氧化物酶(EC.3, 1, 1, 1)同功酶在胚性及非胚性愈伤组织中的酶谱是不相同的。胚性愈伤组织中酯酶同功酶带多,在阳极和阴极各有一条非胚性愈伤组织所不具有的酶带,过氧化物酶同功酶则不同,它在非胚性愈伤组织中的酶带比在胚性愈伤组织中要多,而在继代的胚性愈伤组织中发现其酶带有增加的趋势,但它同时也具有一条胚性愈伤组织特有而非胚性愈伤组织没有的酶带,显示出其特性介于二者之间(图3)。

在胚胎发生过程中这两种酶的同功酶谱均发生变化。酯酶同功酶随发育进程其位于阳极的一胚性愈伤组织特有带消失,但在阴极却出现另一条带。过氧化物酶同功酶也随发育进程其胚性愈伤组织特有的一条带消失,伴随着阳极及阴极带的出现。这说明胚胎发生的进程与酶谱的变化是息息相关的。

3 讨论

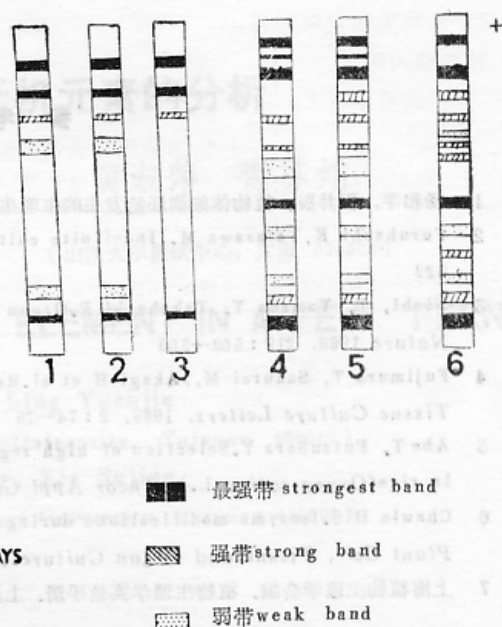
有关植物胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织及体胚发生的生理生化特性研究,近年来已有了很大进展^[1],研究者都力图从本质上去说明胚性与非胚性愈伤组织的差异及体胚发生的机制,有些结果是矛盾的,但却可以看出从生理生化方面去识别两类愈伤组织及体胚发生的进程是可能的。本文的研究说明,蒲晚一号梗稻的胚性及非胚性愈伤组织之间存在着生理生化方面的差异,反映出两类愈伤组织代谢上的差异及对今后彼此发育途径的影响。体胚发生过程中的生理生化变化使我



SS: 可溶性总糖量; WSP: 水溶性蛋白;
 SSP: 盐溶性蛋白; AKP: 碱溶性蛋白;
 ALP: 醇溶性蛋白
 SS: soluble sugar; WSP: water soluble
 protein; SSP: salt soluble protein;
 AKP: alkali soluble protein;
 ALP: alcohol soluble protein

图1 不同发育天数可溶性糖及可溶性蛋白质的变化

Fig.1 Changes of soluble sugar and proteins in different days of development

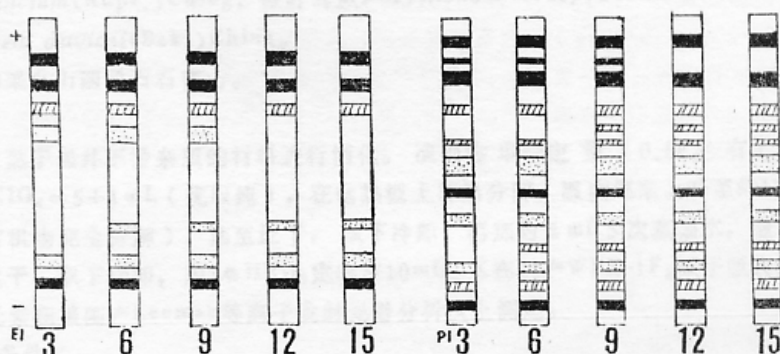


1,4: 胚性愈伤组织; 2,5: 继代10次愈伤组织;
 3,6: 非胚性愈伤组织

1,4: embryonic callus; 2,5: embryonic
 callus subcultured in mannitol for 10
 times; 3,6: non-embryonic callus

图2 酯酶(1,2,3)与过氧化物酶(4,5,6)同功酶谱

Fig.2 Esterase(1,2,3) and peroxidase(4,5,6) isozyme patterns



EI: 酯酶同功酶; PI: 过氧化物酶同功酶
 EI: Esterase isozyme; PI: Peroxidase isozyme

图3 不同发育时期同功酶谱的变化

Fig.3 Changes of isozyme patterns in different days of development

们对胚胎发生与物质代谢有了更深的了解,为水稻组织培养提供了资料。但体胚发生的根本机制今后仍需进一步从分子水平上去探索。

参 考 文 献

- 1 杨和平,程井辰.植物体细胞胚胎发生的生理生化研究进展.植物学通报,1991,8(2):1—8
- 2 Furuhashi K, Yatazawa M. Indefinite culture of rice stem node callus. Kagaku, 1964, 34: 623
- 3 Nishi, T, Yamada Y, Takahashi E. Organ redifferentiation and restoration in rice callus. Nature 1968, 219: 508—509
- 4 Fujimura T, Sakurai M, Akagi H et al. Regeneration of rice plants from protoplast. Plant Tissue Culture Letters, 1985, 2: 74—75
- 5 Abe T, Futsuhara Y. Selection of high regenerative callus and change in isoenzyme pattern in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet, 1989, 78: 648—652
- 6 Chawla H S. Isozyme modifications during morphogenesis of callus from barley and wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988, 12(3): 299—304
- 7 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册. 上海科学技术出版社, 1985. 210—212