

栓皮栎种胚发育过程中储藏物质积累变化研究

郝丽丽, 张存旭*, 杨 阳

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:分析研究了栓皮栎种胚发育过程中几种主要储藏物质含量的变化,种胚储藏蛋白及其积累形式。结果表明:可溶性糖、还原糖、可溶性淀粉和可溶性蛋白含量变化趋势基本相同,随种胚的发育先上升后下降;蛋白电泳条带数随种胚发育也相应增加。

关键词:栓皮栎;种胚;可溶性糖;淀粉;储藏蛋白

中图分类号:S792.18 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2011)04-0128-04

Changes of Storage Substance Accumulation during Zygote Embryos Development of *Quercus variabilis*

HAO Li-li, ZHANG Cun-xu*, YANG Yang

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Changes of several mainly storage substances as well as seed storage protein pattern during zygote embryos development of *Quercus variabilis* were studied. Similar variation trends were found among soluble sugar, reductant sugar, soluble starch and storage proteins content. The contents of these substances increased as the development of the embryo and decreased then. The storage protein band number also increased accordingly.

Key words: *Quercus variabilis*; zygote embryo; soluble sugar; starch; storage proteins

栓皮栎(*Quercus variabilis*)是我国重要的落叶阔叶树种。栓皮栎常规的繁殖方式是有性繁殖,由于其种子不耐储藏、结实期晚、扦插繁殖困难、轮回期长、生根困难等,目前主要依靠天然更新。由于生理老化和通过器官发生再生植株较困难等原因,造成栓皮栎基因资源保存、快繁和遗传改良难度大^[1-3]。体细胞胚胎发生生物技术为林木种质保存、快速繁殖性状优良的植株和遗传改良提供了新途径。虽然目前已获得了栓皮栎体胚再生植株,但成苗率较低,所以这一繁殖系统应用于林木改良仍有一定的难度。本文通过测定栓皮栎种胚发育过程中糖含量、可溶性淀粉含量、储藏蛋白含量的差异;并对种胚的储藏蛋白特性进行分析,以期为改良栓皮栎体胚再生植株培养方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

栓皮栎种胚采自西北农林科技大学北校区五台山山下栓皮栎树,采样从2009年6月15日可以明显看见种胚开始,以15 d为周期采样,直到种胚成熟(即10月5日),每次采30~50颗种胚,将直接摘得种胚放入冰盒,带回放入-20℃的冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 可溶性糖和还原糖含量测定^[4] 将在树体不同位置同一时间采集10颗以上种胚研碎、混匀,称取种胚0.3 g(W),加入1 mL 80%乙醇溶液研磨后,分3次加入4 mL 80%乙醇溶液冲洗于5 mL离心管中,80℃水浴30 min,冷却至室温,随后5 000 rpm离心10 min,取上清液,重复浸提2次最后定容

收稿日期:2010-05-04 修回日期:2010-06-30

基金项目:国家林业局“948”项目(2006-4-54);西北农林科技大学唐仲英育种专项(2009)

作者简介:郝丽丽,女,硕士研究生,主要从事林木生物技术研究。

* 通讯作者:张存旭,男,副教授,主要从事林木遗传育种和林木生物技术教学与研究。E-mail:cxzhang@nwsuaf.edu.cn

至 15 mL 容量瓶中(V_t);该提取液为测定还原糖和可溶性糖(A 液)。

还原糖含量的测定:吸取 A 液 4 mL,置于 5 mL 离心管中,在沸水浴上蒸干,准确加入 5 mL 蒸馏水溶糖,充分摇动溶解,5 000 rpm 离心 10 min,取 2 mL(V_s)上清液(剩余上清液用于可溶性糖测定)于试管中,加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂,在 540 nm 下测定。结果计算:还原糖含量 = $[(C \times V_t)/(W \times V_s)] \times 100\%$, C:从标准曲线上查得或计算出来的样品测定管中葡萄糖含量(mg)。

可溶性糖的测定:将上述测定还原糖剩余的样品液稀释 10 倍(n)后取 2 mL(V_s),加入 5 mL 蒽酮-硫酸试剂,放入 100℃沸水浴中准确加热 10 min,取出后用自来水冷却至室温后测定 620 nm 波长下吸光度。可溶性总糖含量 = $[(C \times V_t \times n)/(W \times V_s \times 1\,000)] \times 100\%$, C:从标准曲线上查得样品测定管中含葡萄糖的量(μg)。

1.2.2 可溶性淀粉含量测定^[5] 称取种胚 0.3 g (W),加 5 mL 80%乙醇研碎,12 000 rpm 离心 15 min,取上清液,重复两次,最后定容至 25 mL。试管中加入样品 2 mL,蒸馏水 2 mL,200 μL $\text{I}_2\text{-KI}$,摇匀 620 nm 测光密度值。淀粉含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) = $(X \times 2 \times V_t)/(V_u \times W \times 1\,000)$,其中 X 为样品稀释至 2 mL 时的样品浓度, V_t 为样品总体积, V_u 为每支试管中加入样品原液的体积, W 为样品鲜重。

1.2.3 可溶性蛋白质含量测定及电泳^[6] 称取种胚 0.3 g,加入蛋白质提取缓冲液,研磨,4℃放置 1 h,8 000 rpm 离心 10 min,吸出上清液 0.4 mL 于另一离心管,再加入 1.6 mL 预冷丙酮,-20℃沉淀蛋白 1 h,14 000 rpm 离心 15 min,去上清液,离心管下部沉淀即为粗提蛋白样品,将沉淀在真空泵中抽真空使丙酮挥发。加入 25 μL 上样缓冲液溶解蛋白质,再加入 25 μL 40%蔗糖溶液,混匀后在沸水浴中热处理 5 min,冷却至室温即为待测蛋白质溶液。取溶液 1 mL,用水补足体积到 4 mL,加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混匀后在 595 nm 测吸光值。

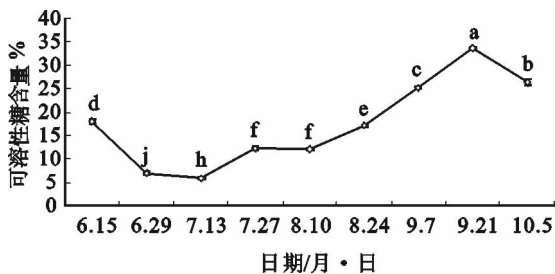
电泳:将上述栓皮栎种胚蛋白提取溶液离心后上样 20 μL ,稳压电泳(浓缩胶 130 V,分离胶 170 V),当溴酚蓝指示剂距胶底部 2 cm 时,停止电泳,剥下胶片后,将胶片放入固定液中固定 2 h,然后考马斯亮蓝 R-250 染色过夜,放入脱色液中脱色,直至胶片背景蓝色完全透明状,数码照相分析。

2 结果与分析

2.1 可溶性糖含量变化

种胚中可溶性糖含量水平标志着源端的同化物

供应能力和反映出库端对同化物的转化、利用能力。图 1 表明,在第一个时间段与第二个时间段期间,可溶性糖含量迅速下降,在第二个时间段和第三个时间段之间,可溶性糖含量稳定在一个较低水平变化不大,第四个时间段可溶性糖含量快速增长比第三个时间段增长了 2.08 倍,在第五和第六时间段又出现了平稳阶段,可能是一段库活性持续期,从第五个时间段开始可溶性糖含量一直呈现升高的趋势,到第八个时间段达到最大值,标志着种胚内同化物的转化利用能力减弱。第八时间段后可溶性糖含量出现了快速的下降。这与李永红等^[7]研究马拉巴栗种子在发育前期,可溶性糖含量迅速上升,到了花后 60 d 达到最大值后再缓慢下降,其中花后 50~60 d 种子可溶性糖增加最快结果相一致。



注:曲线上不同字母表示多重比较差异显著性($\alpha = 0.05$)以下同。

图 1 可溶性糖含量

Fig. 1 Changes of soluble sugar content

2.2 还原糖含量变化

还原糖是可溶性总糖的一部分,它们的动态趋势虽然类似,但还原糖没有可溶性糖第一时间段下降的现象,而从第一个时间段就开始呈上升态势,在第七时间段达到最大值,比第一个时间段增长了 7.01 倍,增率大于可溶性总糖。期间和可溶性糖一样在第二和第三时间段之间出现一个平稳阶段,从第 7 时间段开始呈下降趋势(图 2)。

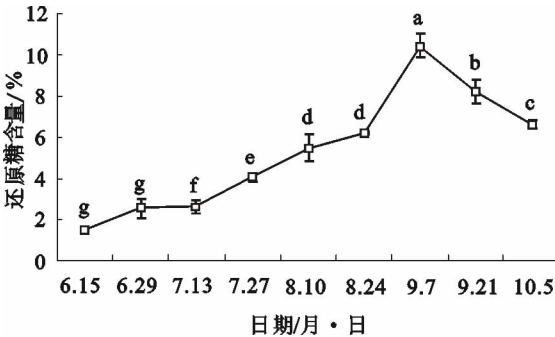


图 2 还原糖含量

Fig. 2 Changes of reductant sugar content

2.3 淀粉含量变化

淀粉含量由图 3 看出,可溶性淀粉含量在前三个时间段变化不大,从第三个时间段开始可溶性淀

粉含量呈快速上升趋势,第四个时间段比第一个时间段增长了 188 倍,在第八个时间段烈日下淀粉含量达到最大值 $196.77\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,是第一个时间段的 1 075 倍。可见,在栓皮栎种胚发育过程中,可溶性蛋白含量呈总体上升趋势。植物体内的可溶性蛋白质大多数是参与各种代谢的酶类,它含量的不断增加是胚生命活动不断增强的指标。从第八个时间段后呈现下降趋势,说明淀粉开始降解,开始转化为可被吸收的小分子物质。

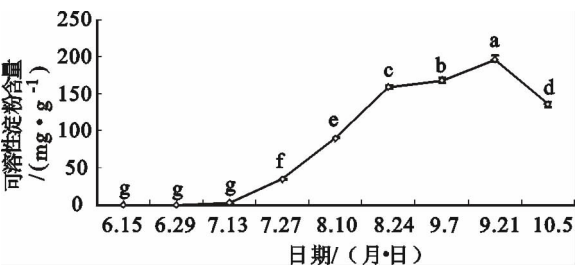


图 3 可溶性淀粉含量

Fig. 3 Changes of soluble starch content

2.4 蛋白质含量变化

从图 4 可见,种胚整个发育期蛋白质含量呈现单峰型趋势,随种胚的发育蛋白质含量呈上升趋势,但在前六个时间段蛋白质增量不大,尤其是第二到第四个时间段蛋白含量的变化没有达到差异,第六个时间段仅比第一个时间段高 58.86%;此后蛋白质含量快速上升,说明剧增时间段是蛋白质积累的重要时间段。在第八个时间段时达最高峰值,其值为 $0.808\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,是第一个时间段的 4.30 倍,然后迅速回落基本和第七个时间段的值相同,这主要是由于这个时间段细胞数目增加和体积变大造成。

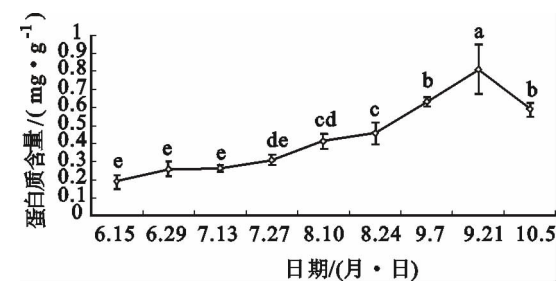


图 4 蛋白质含量

Fig. 4 Changes of soluble protein content

2.5 种胚储藏蛋白谱型

从图 5 可以看出,种胚在发育过程中,98 KD 左右的带最早出现,且随发育时间,带的颜色逐渐加深,到第三个时间段时,35~55 KD 出现了几条新带,只有 64 KD 左右的带不断加深颜色,其它带并没有随种胚的发育而继续,而是在第四个时间段是减弱或消失,从第五个时间段开始有 100、63、42.5、

35、24、15 KD 六条带随发育时间的延长呈逐渐加深的趋势。到第八个时间段出现下降趋势。总体来说,种胚在发育过程中蛋白含量随萌发时间的延长而升高,带数有增有减,但这种带的增与减、相对含量的升与降及其消失主要发生在次级带上,而主带的相对含量随萌发时间的延长呈先上升后下降趋势。

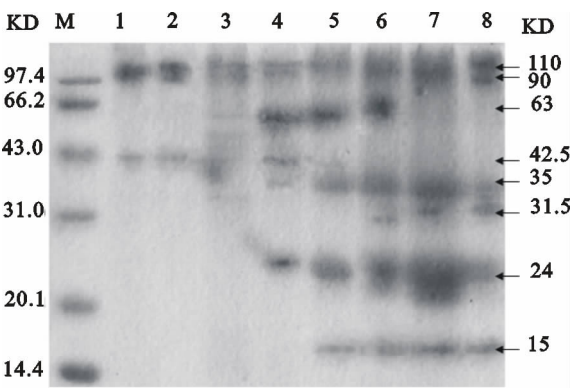


图 5 可溶性蛋白 SDS—PAGE 凝胶电泳图

注:M: marker; 1~8: 分别对应采样的前 8 个时间段

Fig. 5 Electrophoretogram of soluble protein SDS—PAGE

3 结论与讨论

可溶性糖含量的变化趋势,反映了植物体内碳水化合物的运转情况,而且在有机物的代谢中起着重要的作用。这也是种子能顺利萌发和生长的重要生理基础之一[8-9]。栓皮栎种胚发育过程中,可溶性糖变化出现前期先降低后升高再降低的变化规律。前期的降低可能是因为,可溶性糖要为胚的发育提供能量。之后栓皮栎种胚的发育成为植株的生长中心,叶片光合产物不断地运输到种子,使种子迅速发育膨大,可溶性糖也不断积累。还原糖是可溶性总糖的一部分,有较强的生理生化活性[10-11]。本研究得知,栓皮栎种胚发育期间还原糖增长率高于可溶性糖,这些现象可能与其功能有关。但还原糖在种胚发育期间的哪些生理生化反应中起作用还值得深入研究。

淀粉是高等植物重要的储存多糖[12]。在本实验中淀粉含量也随种胚发育不断增加与蛋白质和还原糖的变化趋势基本相同。但可以看出,淀粉前三个时间段可以看到淀粉少量增加,之后淀粉不断增加,直到种胚成熟淀粉的含量达到最高水平。因此淀粉积累量和积累速率决定着子粒生长的速率和种子的好坏。有研究认为,种胚的大小和成熟度是种子发育过程中引起活力差异的主要原因,其中种胚大小造成活力差异的实质是种子贮藏物质如贮藏蛋白等含量上的差异,贮藏蛋白的合成和积累对种子

活力的提高起着重要作用^[13-14]。本实验结果表明,蛋白含量随着种胚发育的逐渐增加,成熟前期(第六个时间段)和中期(第七个时间段)蛋白质积累迅速提高,到生理成熟时间段(第九个时间段)达到最大值,可能这个时间段采收,种胚活力是最大的。

从 SDS—PAGE 电泳图谱分析来看,栓皮栎随着种胚发育蛋白带数和蛋白带强弱都发生了显著的变化。前期变化明显的基本上为条带较窄、含量较少的蛋白质,对于含量较大的蛋白质则表现不明显,随着发育的进行,在第八个时间段时达到最高值与蛋白含量的测定结果相一致。种胚在发育的早期,出现 98 KD 的条带,且随发育时间段,带的颜色逐渐加深。在随后的发育中,35~55 KD 出现了几条新带。总体来说,种胚在发育过程中蛋白含量随萌发时间的延长而升高,带数有增有减,但这种带的增与减、相对含量的升与降及其消失主要发生在次级带上,而主带的相对含量随萌发时间的延长呈先上升后下降趋势。

目前,对于种胚发育中储藏物质的研究虽然取得了一定进展,但在储藏物质生理变化变化规律和种子劣变机制等方面仍存在着很多需要解决的问题。因此,有必要开展种子贮藏生理的进一步研究,弄清种胚活力变化和种子劣变的本质,提高种胚贮藏寿命,这在理论上和实践上都有重要意义。近年来,已能从栎属植物成年组织诱导出体胚^[15]。储藏蛋白作为种胚蛋白的主要部分,主要为萌发和发育过程提供氮和碳骨架的来源。在鉴定林木成熟体胚的储藏蛋白及其积累形式已有报道^[16,17]。本研究认为,通过种胚发育过程中储藏蛋白质电泳图谱分析,可以直观地判断栓皮栎种胚的发育水平。

参考文献:

[1] 周建云,林军,何景峰,等. 栓皮栎研究进展与未来展望[J]. 西北林学院学报, 2010,25(3):43-49.
ZHOU J Y, LIN J, HE J F, *et al.* Review and perspective on *Quercus variabilis* research [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010,25(3):43-49.

[2] 郑万钧. 中国树木志 (第二卷)[M]. 北京:中国林业出版社, 1985:2330.

[3] 中国森林编辑委员会. 中国森林 (第三卷)[M]. 北京:中国林业出版社,2000:1190-1198.

[4] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1992.

[5] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社, 2002.

[6] 张焕玲. 栓皮栎体胚成熟与萌发研究[D]. 陕西 杨陵:西北农

林科技大学,2008.

[7] 李永红,马颖敏,许柏球,等. 马拉巴栗种子发育中可溶性糖变化与种子脱水耐性的关系[J]. 中国农业科学,2009,42(8): 2882-2891.
LI Y H, MA Y M, XU B Q, *et al.* Relationship between dehydration tolerance and soluble sugars during seed development of *Pachira macrocarpa* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8):2882-2891.

[8] 黄宇,熊治廷,郭明武,等. 种子发育过程中糖的吸收和代谢过程[J]. 种子,2007, 26 (4):51-54.
HUANG Y, XIONG Z T, GUO M W, *et al.* Sugar import and metabolism during seed development[J]. Seed, 2007, 26 (4): 51-54.

[9] 王延琴,杨伟华,许红霞,等. 棉子萌发过程中营养物质和棉酚的变化动态[J]. 中国棉花,2003, 30(4): 11-13.

[10] JYOTI C., NARINDER K., ANILK G. Ontogenic changes in enzymes of carbon metabolism in relation to carbohydrate status in developing mungbean reproductive structures [J]. Phytochemistry, 2000,53(5):539-548.

[11] TSUNG M. K, CADANCE A L, PATRICK T S. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues[J]. Plant Sci, 1997,125(1):1-11.

[12] 王建波,陈家宽,利容千,等. 冠果草种子萌发过程的组织化学动态[J]. 西北植物学报, 1997,17(1):13-19.
WANG J B, CHEN J K, LI R Q, *et al.* Histochemical changes in seed germination process of *Sagittaria Guyanensis* Subsp. *Lappula* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 1997,17(1):13-19.

[13] 杨学军,喻方圆,张欢喜. 种子贮藏蛋白质表达调控及应用研究进展[J]. 武汉植物学研究,2008,26(2): 203-212.
YANG X J, YU F Y, ZHANG H X. Progress in research and application on expression and regulation of seed storage protein[J]. Journal of Wuhan Botanical Research,2008,26(2): 203-212.

[14] 郑文寅,张文明,姚大年. 大豆种子活力与贮藏蛋白关系的研究[J]. 种子,2009,28(5):39-42.
ZHENG W Y, ZHANG W M, YAO D N. Study on the relation on soybean seed vigor and storage protein[J]. Seed, 2009,28(5):39-42.

[15] 张存旭,姚增玉. 栎属植物体细胞胚胎发生研究现状[J]. 西北植物学报,2004,24(2): 356-362.
ZHANG C X, YAO Z Y. Recently research situation of somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2004,24(2): 356-362.

[16] ZHANG C X, YAO Z Y, ZHAO Z, *et al.* Histological observation of somatic embryogenesis from cultured embryos of *Quercus variabilis* Bl. [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology 2007, 33 (1): 33-38.

[17] TAUTORUS T E., FOWKE L C., DUNSTAN D I. Somatic embryogenesis in conifers[J]. Can J Bot, 1991,69(9): 1873-1899.