

ABA 和 PEG 对胡萝卜体细胞胚诱导和调控的影响^{*}

高述民

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对ABA 和PEG 诱导胡萝卜(*Daucus carota* L.) 体细胞胚发生及其调控体细胞胚发育的效应进行了研究。在MS 液体培养基中(含蔗糖30 g/L)附加10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 或100 g/L PEG 6000 诱导体细胞胚, 能使其提早发生7~10 d, 而且能使子叶胚处于调控状态。确定了ABA 和PEG 在MS 液体培养基中(含蔗糖10 g/L)调控胡萝卜体细胞胚发育的下限浓度分别为1 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 200 g/L PEG 6000, 细胞学观察表明此种状态的胚缺乏营养。采用双向电泳分离出与ABA 和PEG 渗透调节密切相关的特异蛋白质多肽S₁, 分子量27.9 ku, 等电点6.0左右。

[关键词] ABA; PEG; 胡萝卜; 体细胞胚; 发育调控

[中图分类号] S631.203.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)02-013-04

植物的形态建成是基因组按一定的时空顺序选择性表达的结果, 其中与植物器官发生相关的基因的表达和调控问题, 是植物器官发育中的核心课题。目前, 一些发育缺陷突变体相继被分离、鉴定, 尤其是对花器官发育相关基因的研究比较多, 已克隆了一些重要基因, 但对植物器官发生的机理了解的仍然很少^[1]。本研究探讨了ABA 和PEG 对胡萝卜体细胞胚发生和同步化调节的影响, 并对其诱导的相关蛋白质进行了初步研究。

1 材料和方法

选用胡萝卜品种为日本国分大长人参。取胡萝卜幼苗(子叶平展期)于700 mL/L 乙醇中浸泡15 s, 无菌水冲洗2遍, 再用1 g/L 升汞浸泡消毒8 min, 无菌水冲洗3遍。将子叶、下胚轴剪成3~4 mm 长的切段接种在MS 培养基上继代培养, 每3周继代1次。挑选白色透明、疏松的胚性愈伤组织块, 接种在MS 液体培养基中(附加10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 或100 g/L PEG 6000)悬浮培养, 诱导体细胞胚, 摇床转速110 r/min, 每周继代1次。以上培养温度(26±1)℃, 光照16 h/d, 参照Damerval等^[2]的方法提取10 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 100 g/L PEG 6000 分别处理的调控胚(MS 中含30 g/L 蔗糖)及去除ABA, PEG 24 h后的解调控子叶胚的全蛋白质。参照O'Farrell^[3]的方法双向电泳分离与ABA、PEG 调节

相关的特异蛋白质, 银染观察。两性电解质载体、等电点和分子量标记均购自Pharmacia公司, 丙烯酰胺、尿素等电泳试剂均购自上海生工公司。

2 结果与分析

2.1 ABA 和PEG 对胡萝卜体细胞胚发生及调节的影响

采用MS 液体培养基附加10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 或100 g/L PEG 6000 悬浮诱导胡萝卜体细胞胚, 结果表明(表1), 与30 g/L 蔗糖诱导的正常出胚速度相比, 附加10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 能提早1周出胚, 附加100 g/L PEG 6000 能提早10 d 出胚。两者都能使子叶胚处于相对静止状态, 具有调节体细胞胚进一步发育的作用。ABA 处理的胚, 易产生一定量的次生胚, PEG 处理的胚体上则产生相对较少的次生胚(图版I, 2), 在诱导体细胞胚发生时, PEG 处理的产生大量的薯形单细胞。

ABA, PEG 能促进胚的成熟, 这与Laurent等^[4]对三叶胶(*Hevea brasiliensis*)的研究结果一致。内源ABA 的含量随外源ABA 施入量的增加而比例地增加。它可能通过与体内其他激素如GA₃的相对平衡起调节作用。通常ABA 对DNA 和多种RNA 的合成有抑制作用^[5], 但却能诱导胚特异蛋白质和mRNA 的合成, 积累贮藏蛋白, 从而促进胚体早熟。ABA 可能通过诱导 α -淀粉酶抑制剂, 拮抗

* [收稿日期] 2000-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39630040 和 39570399), 实验在中国科学院发育研究所进行。

[作者简介] 高述民(1962-), 男, 湖北鄂城人, 主要从事植物发育生物学研究, 现在北京林业大学博士后流动站工作, 北京 100083。

GA₃ 对 α-淀粉酶的诱导, 或促进脯氨酸加速累积^[6], 或通过蛋白质磷酸化起调节作用^[7], 抑制成熟胚萌发。

表 1 ABA 和 PEG 胡萝卜体细胞胚发生及调控的影响

Fig 1 Effects of ABA and PEG on fomation and regulation of carrot somatic embryos				
处 理 Treatment	出胚时间/d Time of embryogenesis	调控状态 Regulating states	次生胚发生状况 Secondary embryo	备 注 Notes
30 g/L 蔗糖 30 g/L sucrose	34	未发绿 No greening	-	
30 g/L 蔗糖+ 10 μmol/L ABA 30 g/L sucrose+ 10 μmol/L ABA	27	控制住 No secondary embryo	++	
30 g/L 蔗糖+ 100 g/L PEG 6000 30 g/L sucrose+ 100 g/L PEG 6000	24	控制住 No secondary embryo	+	薯形细胞多 More yam-shaped cells
50 g/L 蔗糖 50 g/L sucrose	30	控制住 No secondary embryo	++	

注: 次生胚状况: 少(+), 多(++), 无次生胚(-)。
Note: Secondary embryo: few(+); more(++); no secondary embryo (-)。

PEG 的高渗透压引起水分胁迫, 使细胞内正常的蛋白质合成受到抑制, 相应地诱导一些胁迫蛋白质合成, 调节代谢, 抑制愈伤组织细胞的分裂, 加速胚的发育, 使胚体早熟并抑制成熟胚的萌发。另外, 高渗透常导致内源ABA 的增加, 也可能通过ABA 的作用来影响胚的发育。

2 2 ABA 和 PEG 对胡萝卜子叶胚生长的调节作用

将MS 液体培养基中(含蔗糖 50 g/L)已处于调控状态的子叶胚转移到MS 液体培养基中(含蔗糖 10 g/L), 另分别附加不同浓度 ABA 或 PEG 6000, 悬浮培养结果见表 2。

表 2 ABA 和 PEG 对胡萝卜体细胞胚及胚根生长的影响(培养 14 d)

Table 2 Effects of ABA and PEG on embryogenesis and the growth of embryo radicles (cultured 14 d)						
处理 Treatment	浓度 Concentration	胚数 No. of embryo	生根胚数 Gem inating embryos	生根胚率/% Gem inating frequency	胚体颜色 Embryo colour	生长势 Grow th potency
PEG ₁	100 g/L	102	39	38.2	绿 Green	++ (粗壮) Strong
PEG ₂	120 g/L	53	14	26.4	浅绿 Light green	++ (粗壮) Strong
PEG ₃	150 g/L	66	15	22.7	浅绿 Light green	++ (粗壮) Strong
PEG ₄	200 g/L	-	0	0	浅黄 Light yellow	++ (粗壮) Strong
ABA ₁	0.38 μmol/L	98	10	10.2	黄绿 Green-yellow	++
ABA ₂	0.62 μmol/L	55	3	5.5	黄绿 Green-yellow	++
ABA ₃	0.86 μmol/L	87	4	4.6	浅黄 Light yellow	++
ABA ₄	1 μmol/L	97	0	0	浅黄 Light yellow	++
蔗糖(CK) Sucrose	50 g/L	168	0	0	浅黄 Light yellow	++

注: ++ 表示生长势强。
Note: ++ high potency on growing

在实验浓度范围内, 随施用浓度提高, 调节作用增强, 胚体颜色由绿变成浅黄色。完全调控住胚的生长的浓度下限 ABA 为 1 μmol/L, PEG 6000 为 200 g/L。另外, ABA 处理的胚体正常, PEG 处理的胚体膨大, 表现出毒害作用(图版 3, 4)。上述调控胚在去除 ABA、PEG 后能正常萌发生成幼苗(图版 5, 6)。

以上结果进一步说明, 高渗透压能抑制体细胞

胚的根和芽进一步发育。

2 3 ABA 和 PEG 调节体细胞胚发育的细胞组织化学观察

对MS 液体培养基中(含蔗糖 10 g/L)附加 1 μmol/L ABA 或 200 g/L PEG 6000 调节的体细胞胚胚根切片观察结果表明, 与 50 g/L 蔗糖调控的子叶胚相比, ABA 和 PEG 处理的胚根伸长区细胞中的淀粉颗粒大, 但颜色浅, 淀粉粒明显少, 说明

ABA 和 PEG 调节下的胡萝卜体细胞胚中糖代谢仍然在进行, MS 培养基中的 10 g/L 蔗糖不能满足胚体的正常代谢需要。仅靠渗透作用来调节体细胞胚的发育, 不可能获得高质量的同步化体细胞胚。

2.4 ABA 和 PEG 调节下的体细胞胚中特异蛋白质的变化

对 MS 液体培养基中(含蔗糖 10 g/L)附加 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 或 100 g/L PEG 6000 悬浮的调控子叶胚和去除 ABA 和 PEG 24 h 后的解调控胚中的蛋白质进行了双向电泳图谱分析, 结果表明,

ABA 和 PEG 处理时, 均存在 S_1 点(图版 7, 9), 当去除 ABA 和 PEG 24 h 后, S_1 点消失(图版 8, 10)。 S_1 与 ABA 和 PEG 的调节作用紧密相关。 S_1 点分子质量为 27.9 ku, 等电点 6.0 左右。ABA 和 PEG 处理的调控胚中 S_1 点有相同的变化规律, 表明 ABA 和 PEG 对体细胞胚的调节可能经历共同的途径, 有可能 PEG 引起胚体内 ABA 的变化, 由 ABA 完成对胚体的一系列调控作用, 或者 PEG 和 ABA 二者先分别经历不同途径, 激活相同的或不同的反式作用因子, 但最终调节同一基因的表达。

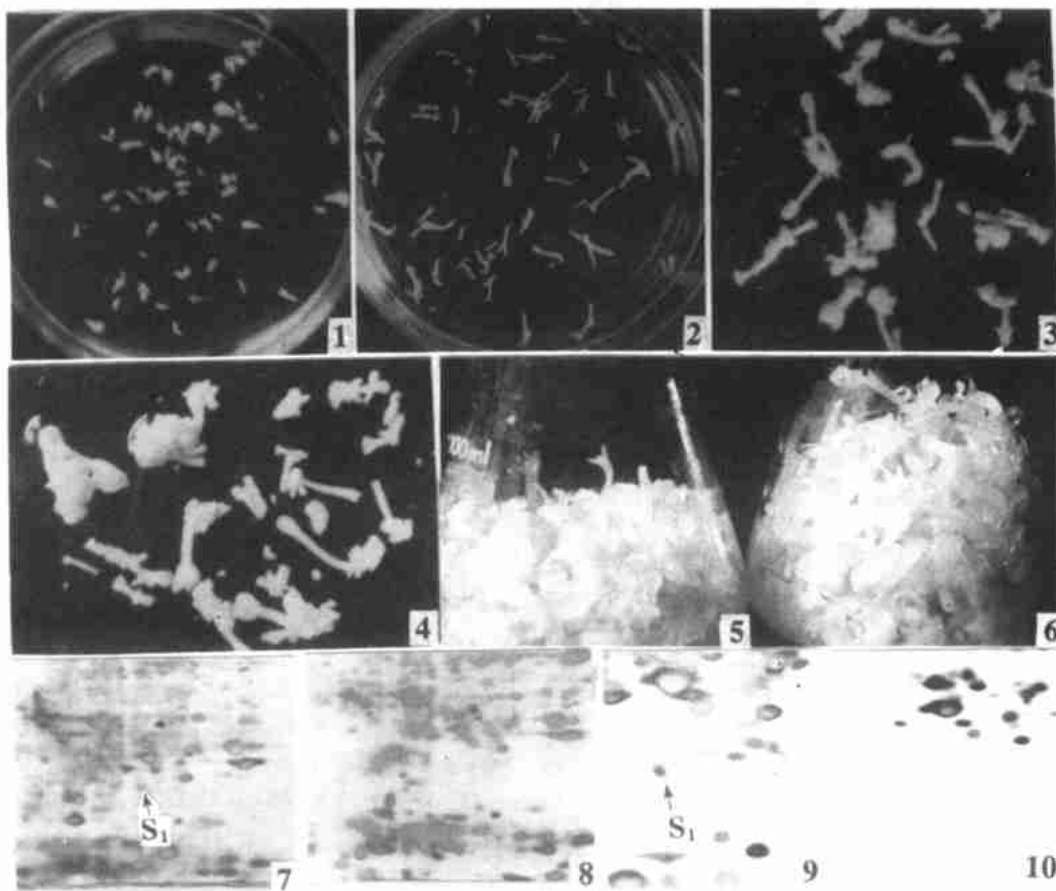


图 1~10 ABA 和 PEG 对胡萝卜体细胞胚诱导和调控的影响

1 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理形成的调控胚; 2 100 g/L PEG 6000 处理形成的调控胚; 3, 4 1 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理的调控胚(3)及其解调控状态(4); 5, 6 200 g/L PEG 6000 处理形成的调控胚(5)及其解调控状态(6); 7, 9 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA (7)和 100 g/L PEG 6000 (9)处理的调控胚中蛋白双向电泳局部图谱; 8, 10 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 和 100 g/L PEG 6000 处理的调控胚去除 ABA (8), PEG (10) 24 h 后的蛋白双向电泳局部图谱。

Fig. 1-10 Effects of ABA and PEG on the embryogenesis and regulation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos
1 Regulated-embryo forming by 10 $\mu\text{mol/L}$; 2 Regulated-embryo forming by 100 g/L PEG 6000; 3, 4 Regulated-embryo forming by 1 $\mu\text{mol/L}$ (3) and deregulating (4); 5, 6 Regulated-embryo forming by 200 g/L PEG 6000 (5) and deregulating (6); 7, 9 The portion pattern on total proteins of regulated-embryo (treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA (7) or 100 g/L PEG 6000 (9), Esp.) by 2D electrophoresis; 8, 10 The portion pattern on total proteins of deregulating embryos (removed 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA (8) or 100 g/L PEG 6000 (10) for 24 h, Esp.) by 2D electrophoresis

3 讨 论

3.1 体细胞胚的同步化培养

以往获得同步胚,从愈伤组织细胞分裂开始便需要进行严格的同步分裂控制。现在用 ABA, PEG 等进行调控,结合出胚期及其分级培养,容易使其整齐一致。

良好的体细胞胚不仅能使其调控住,即处于子叶胚期相对静止状态,而且胚体内要有充足的营养如碳水化合物等。因此,MS 培养基中蔗糖浓度应以 30 g/L 为宜,在此基础上附加 ABA, PEG 可能获得较理想的培养效果。

3.2 ABA 对体细胞胚的诱导和调控效应

ABA 在体细胞胚的诱导和调控中起重要作用。

通常低浓度(1~ 10 $\mu\text{mol/L}$)能促进体细胞胚发生,高浓度(10 mmol/L 以上)则抑制体细胞胚的发生。此外,ABA 对体细胞胚的促进和抑制作用,还与胚体的生理状态密切相关。ABA 诱导体细胞胚发生及调控效应的详细机制,尚有待于进一步对有关的突变体或对 ABA 信号传递的中间环节及其产物进行研究。

3.3 S₁ 特异蛋白质多肽

S₁ 蛋白质多肽与 ABA 和 PEG 的调控作用密切相关。从时空变化规律上分析, S₁ 不是结构蛋白,很可能是一种与渗透应答或与体细胞胚的根器官发育启动事件有关的基因表达产物。可进一步采取生化免疫分析或测序制成混合探针克隆有关的基因并进行表达与调控的分析研究。

[参考文献]

- [1] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the shorts: genetic interactions controlling flower development[J]. Nature, 1991, 353: 31- 37.
- [2] Damerval C de, Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins[J]. Electrophoresis, 1986, 7: 52- 54.
- [3] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007 - 4021.
- [4] Laurent L, Philippe V, Françoise C, et al. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development[J]. Plant Science (Shannon), 1997, 124(2): 183- 191.
- [5] Pearson J A, Wareing P P. Effect of abscisic acid on activity of chromatin[J]. Nature, 1969, 221: 672- 673.
- [6] 陈培元. 作物对干旱逆境的反应和适应机理[A]. 吴相钰主编. 植物生理补充教材——纪念 56 教学研讨会 40 周年[C]. 北京: 北京大学出版社, 1996.
- [7] Anderberg R J, Walker-simmons M K. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein Kinases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10183- 10187.

Effects of ABA and PEG on the embryogenesis and regulation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos

GAO Shu-min

(College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: ABA and PEG effects on embryogenesis and regulation of carrot somatic embryos have been studied. When callus are suspended in MS liquid medium (containing 30 g/L sucrose and 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA or 100 g/L PEG 6000), the embryos can be promoted precociously by 7- 10 days and the mature embryos be prevented from germination. Culturing in MS medium (containing 10 g/L sucrose), the regulated minimum concentrations of ABA and PEG 6000 are 1 $\mu\text{mol/L}$ and 200 g/L respectively. The somatic embryo is short of nutrition by cytology observation. Special protein S₁, closely related to the osmotic regulation of ABA and PEG, is separated (MW 27.9 ku, pI 6.0). From these results, we have found the bases for researching about molecular mechanism of embryogenesis in vitro and gene expression or regulation.

Key words: ABA; PEG; carrot; embryogenesis; growth regulation