

赤霉素对发育的大豆种子中同化物卸出和积累的影响

张蜀秋 戴玉玲 杨世杰

(中国农业大学农业部植物生理生化重点开放实验室)

摘要 用微注射法将不同浓度的赤霉素 (GA_3) 引入开花后30d的大豆种子幼胚的2片子叶中间的质外体空间,同时给叶片饲喂 $^{14}CO_2$,以种皮和子叶中放射性强度来比较分析 GA_3 对同化物卸出的影响,分析了种皮和子叶中的酸性转化酶活性,发现 $GA_3 1 \times 10^{-5} mol \cdot L^{-1}$ 使种皮中酸性转化酶活性提高而子叶中酶活性降低,从而促进种皮同化物的卸出和向子叶的分配。实验结果还表明,引入 GA_3 影响了种子内源脱落酸 (ABA) 水平,而且子叶中的ABA含量变化和同化物积累相关, $GA_3 1 \times 10^{-5} mol \cdot L^{-1}$ 使子叶中ABA水平上升,伴随总糖、蔗糖和蛋白质的积累增加, $GA_3 1 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$ 却使ABA水平下降,而且物质积累也减少。

关键词 大豆; 赤霉素; 脱落酸; 转化酶; 同化物卸出

分类号 Q 945

Effects of Exogenous GA_3 on Unloading and Accumulation of Assimilates in Developing Soybean Seeds

Zhang Shuqiu Dai Yuling Yang Shijie

(Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture)

Abstract By using $^{14}CO_2$ as label to monitor assimilate translocation, effects of exogenous GA_3 on unloading and accumulation of assimilates in developing soybean (*Glycine max*) seeds were investigated. For GA_3 treatment, exogenous GA_3 was injected into the exoplast space of developing cotyledons. The results showed that exogenous $GA_3 (1 \times 10^{-5} mol \cdot L^{-1})$ stimulated activity of acid invertase, which in turn enhanced assimilate unloading. The results also showed that the addition of exogenous $GA_3 (1 \times 10^{-5} mol \cdot L^{-1})$ resulted in the increase of endogenous ABA and the increase of ABA was correlated with the increase of sugar and protein contents. However, the increase of exogenous GA_3 from $1 \times 10^{-5} mol \cdot L^{-1}$ to $1 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$ resulted in the decrease of ABA content and consequent decrease of sugar and protein contents.

Key words *Glycine max*; GA_3 ; ABA; acid invertase; assimilate unloading

作物的经济产量一方面决定于净光合速率的高低,同时也决定于光合同化物是否能快速有效地向经济器官运输和分配。光合同化物从叶片向籽粒的转移又受体内光合产物的形成、装载、运输及卸出这4个既相互联系又相互制约的过程所决定。其中激素对库器官同化物卸出过程有重要的调节作用,一些研究表明脱落酸 (ABA) 可提高酸性转化酶活性,促进蔗糖的卸出

收稿日期: 1999-06-21

国家重点基础研究发展规划项目资助 (G1999011700)

张蜀秋,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区), 100094

和同化物的积累^[1,2]。但赤霉素(GA₃)对正在发育的大豆种子中同化物卸出的影响的报道甚少。我们以正在发育的大豆种子为实验材料,用微注射法将GA₃引入发育的种子,对不同浓度的GA₃对大豆种子中光合同化物的卸出以及可能的调节机理进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验所用大豆(*Glycine max* L.)为加拿大引进的早熟品种M apple Arrow,种植于中国农业大学科学园区,自然条件下生长,在开花后30 d左右,选择生长健壮、荚果均匀一致的植株作为实验材料。

1.2 实验方法

用缓冲液^[3](MES 2 mmol·L⁻¹, CaSO₄ 0.5 mmol·L⁻¹, 甘露醇 200 mmol·L⁻¹, pH 5.5)配制浓度为GA₃ 1×10⁻⁴ mol·L⁻¹、1×10⁻⁵ mol·L⁻¹处理溶液,用微量注射器将激素溶液引入大豆种子内2片子叶中间,以同一荚果的相邻种子作为对照,注入同量不含激素的缓冲液^[4]。

CO₂标记:上述处理好的植株,每株留下叶腋处有处理果荚的3~4片叶片,去掉其余的叶片和荚果,进行¹⁴C O₂的标记。以Ba¹⁴CO₃加一定量的载体BaCO₃和H₂SO₄反应,生成¹⁴C O₂,使密闭系统中CO₂浓度达到1%,¹⁴C O₂的比强为10 μCi·L⁻¹。标记3 h后取样,液氮快速冷冻,分别测定种皮和子叶中的放射性强度。

放射性测定:将待测材料放入闪烁瓶中,加入一定量的消化液,在80 ℃下消化4 h,冷却后加入甲苯闪烁液,置黑暗中24 h后,用Backman LS-580液体闪烁计数器测定放射性强度。

酸性转化酶测定:参照植物生理学实验手册的方法进行测定^[5]。

ABA含量测定:GA₃处理7 d后,称取一定量的种皮和子叶,液氮速冻后用含BHT的80%甲醇提取,用超微量酶放大ELISA进行测定^[6]。

其他代谢物质包括总糖、蔗糖和蛋白质等在注射GA₃后7 d取样,液氮速冻后采用常规方法测定^[7]。

2 结果和分析

2.1 GA₃对同化物卸出的影响

大豆种子胚与种皮间没有共质体联络,由叶片运往荚果的光合同化物通过种柄维管束迅速进入种皮,经由种皮与胚之间的质外体空间后被子叶吸收,供胚生长、发育以及在子叶中转化和贮藏。进入种皮的光合同化物是否能快速有效地卸出到质外体空间,维持种皮韧皮部周围薄壁细胞相对较低的蔗糖浓度,使同化物源源不断地向种子运输,是决定子叶中物质积累的重要因素。然而,光合同化物在种皮和胚之间的运输与分配又是相互制约的,在叶片运往种子的光合同化物量一定的情况下,种皮中滞留的多则运往胚中的就少,相反,运往胚中的增加。因而在种子发育的某一定时期,种皮或子叶占整个种子重量的百分比可作为衡量同化物卸出的一项指标^[8]。在本实验中,用GA₃处理后种皮和子叶中的放射性强度占整个种子放射性强度的百分数来进行处理与对照之间平均数成对数据的T检验,以判断GA₃对光合同化物卸出的作用。

从表 1 所列结果看出, 种皮中的放射性强度均比子叶中低, 说明同化物经种皮卸出后已大量积累到子叶中。 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3$ 处理对种皮和子叶中的放射性强度几乎没有影响; 而 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3$ 处理使种皮中的放射性强度较对照降低约 10%, 而子叶中的放射性强度增加约 10%, 按统计学的 t 检验达到显著差异水平。说明 GA_3 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理可促进同化物的卸出和向子叶中的分配。

表 1 放射性强度测定

$c(\text{GA}_3)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	部位	放射性强度/dpm		t ($t_{0.05} = 3.18$)
		对照	处理	
1×10^{-4}	种皮	781 ± 164(13.2)	774 ± 148(15.0)	- 0.21
	子叶	5 144 ± 1 009(86.8)	4 395 ± 459(85.0)	0.21
1×10^{-5}	种皮	9 384 ± 2 617(42.9)	6 017 ± 1 996(31.4)	3.14
	子叶	12 491 ± 2 559(57.1)	13 150 ± 2 130(68.6)	- 3.14

注: 每个处理 6 次重复, 表中数据为平均值 ± 标准误, 括号内为种皮或子叶占整个种子放射性强度的百分数。

2.2 GA_3 对种皮和子叶中转化酶活性的影响

为了了解促进或抑制同化物卸出的可能机理, 测定了种皮与子叶中与卸出有关、可作为库活性强弱重要标志的酸性转化酶的活性。种子发育的一定时期, 种皮中酸性转化酶的活性和蔗糖水解、卸出相关, 从表 2 中看出, 种皮中的酸性转化酶活性比子叶中的酶活性高, 使种皮中蔗糖水解, 利于卸出。 GA_3 处理使酶活性发生变化, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3$ 处理后, 种皮中转化酶活性明显低于对照, 而减弱了种皮中同化物的卸出。 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3$ 处理后, 种皮中转化酶活性明显高于对照, 而子叶中转化酶活性却低于对照, 促进了种皮同化物的卸出。由此可见, 一定浓度的赤霉素处理可通过调节酸性转化酶的活性来影响种皮的同化物卸出。

表 2 GA_3 对种皮和子叶中酸性转化酶活性的影响

$c(\text{GA}_3)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	部位	对 照	处 理	分解蔗糖 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, fw
				$t(t_{0.05} = 2.09)$
1×10^{-4}	种皮	1.27 ± 0.05	0.96 ± 0.06	4.32
	子叶	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.74
1×10^{-5}	种皮	0.17 ± 0.03	0.46 ± 0.09	- 4.11
	子叶	0.32 ± 0.02	0.17 ± 0.02	7.24

注: 每个处理 20 个重复, 表中数据为平均值 ± 标准误。

2.3 GA_3 处理对种子中 ABA 含量的影响

外源激素的施用会影响内源激素的水平。引入 GA_3 后, 种皮和子叶中的 ABA 含量发生了不同的变化。从表 3 中所列结果可以看出, 在种子发育的一定时期, 子叶中的 ABA 含量高于种皮, GA_3 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使种皮和子叶中的 ABA 均增加, 与表 2、4 结果联系起来看, 说明 ABA 含量的增加与转化酶活性及物质的积累有一定的关系。

表3 GA₃ 处理对种皮和子叶中ABA 含量的影响

$c(\text{GA}_3)/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	部 位	对 照	处 理	$b/(\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}, \text{fw})$ $t(t_{0.05}=4.30)$
1×10^{-4}	种皮	7.33 ± 0.70	5.54 ± 0.25	2.50
	子叶	13.58 ± 1.27	9.89 ± 0.82	1.55
1×10^{-5}	种皮	4.23 ± 0.99	6.13 ± 1.61	-4.63
	子叶	8.95 ± 0.29	10.28 ± 0.27	-4.21

注: 每个处理3次重复, 表中数据为ELISA测定的平均值 ± 标准误。

2.4 激素对种子代谢的影响

引入激素到种子中后, 不仅会影响种皮的卸出, 更会影响种子的代谢和物质的积累。测定结果表明, 2种浓度的GA₃处理后, 子叶中的总糖、蔗糖和蛋白质含量和对照相比都发生了变化, 其中 $1 \times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃处理后, 总糖和蔗糖含量都增加, 差异达到显著水平, 但蛋白质含量没有增加; 而 $1 \times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃处理后, 总糖、蔗糖和蛋白质都明显下降(表4)。与表2和表3联系起来看, ABA含量增加时, 种皮转化酶活性提高而子叶转化酶活性明显降低, 就促进同化物的卸出和子叶中积累。

表4 GA₃ 对子叶中糖的积累和转化的影响

$c(\text{GA}_3)/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测定成分	对 照	处 理	$w/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}, \text{fw})$ $t(t_{0.05}=2.11)$
1×10^{-4}	总糖	12.08 ± 0.11	9.92 ± 0.12	15.50
	蔗糖	5.58 ± 0.08	4.56 ± 0.08	8.77
	蛋白质	9.07 ± 0.08	8.64 ± 0.08	3.25
1×10^{-5}	总糖	10.79 ± 2.22	13.21 ± 0.42	-4.82
	蔗糖	6.14 ± 0.19	9.37 ± 0.39	-7.08
	蛋白质	11.10 ± 0.18	11.30 ± 0.20	-0.70

注: 每个处理20个重复, 表中数据为平均值 ± 标准误。

3 讨论

植物种子中的光合同化物卸出可经共质体和质外体两条途径, 大豆种子的胚与种皮间没有共质体联系, 从荚果的筛管运来进入种皮的蔗糖先卸出到种皮和胚之间的质外体空间, 我们的研究已经证明施用细胞分裂素可明显影响大豆种子同化物的卸出和种子中物质的积累^[9]。在本实验中, 外源GA₃也对种皮同化物的卸出产生了一定的影响, $1 \times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃处理能促进种皮的卸出。从实验结果分析, 赤霉素可能是通过调节酸性转化酶的活性而起作用的, 库端的酸性转化酶水解蔗糖, 维持筛管末端质外体空间较低的蔗糖浓度, 防止其重新装载, 而蔗糖水解使质外体空间的水势降低, 从而促进筛管中糖和水的流出, 因而, 种皮中的转化酶活性高则促进卸出。

目前认为, ABA可通过促进同化物的卸出、库细胞的吸收和物质转化而提高植物的库强

度^[10]。Ackerson^[1]等报道 ABA 处理大豆可提高转化酶的活性,使葡萄糖含量增加而促进种子生长。本试验结果证实,一定浓度的 GA₃ 处理后,也影响了种子的内源 ABA 含量和转化酶活性,同时 ABA 的变化对同化物的积累有明显的影响: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 使种皮中 ABA 含量升高,酸性转化酶活性增强,促进卸出;子叶中 ABA 含量升高,糖的积累也增多。但是,ABA 对植物库强度的调节及其和同化物卸出、积累的关系还需进一步研究。在施用外源生长调节剂以促进种子发育时,应考虑到外源物质对内源激素水平的影响所引起的综合效应。

参 考 文 献

- 1 Ackerson R C. Invertase activity and abscisic acid in relation to carbohydrate states in developing soybean reproductive structures. *Crop Science*, 1985, 25: 615~ 618
- 2 Schussler J R, Brenner M L, Brun W A. Relationship of endogenous abscisic acid to sucrose level and seed growth rate of soybeans. *Plant Physiol*, 1991, 96: 1308~ 1313
- 3 Wolswinkel P, Ammerlaan A. Phloem unloading in developing seeds of *Vicia faba* L. *Planta*, 1983, 158: 205~ 215
- 4 戴玉玲,张蜀秋,杨世杰,娄成后. 研究种子同化物卸出的微注射法和空种皮杯法. *植物生理学通讯*, 1997, 33 (5): 363~ 367
- 5 上海植物生理学会编. *植物生理学实验手册*. 上海:上海科学出版社,1985
- 6 Zhang S Q, Hite D R C, Outlaw Jr W H. Modification required for abscisic acid microassay (enzyme-amplified ELISA). *Physiol Plant*, 1991, 83: 304~ 306
- 7 韩雅珊. *食品化学实验指导*, 北京,北京农业大学出版社,1992
- 8 Wolswinkel P, Koerseman-kooij J W. Sucrose transport into, and unloading from the seed coat of empty ovules of *Pisum sativum* over time-spans greater than three hours. *J Plant Physiol*, 1992, 140: 687~ 690
- 9 戴玉玲,张蜀秋,杨世杰. 细胞分裂素对大豆种子发育时期同化物卸出及胚代谢的影响. *作物学报*, 1998, 24 (5): 613~ 617
- 10 周睿,杨洪强,束怀瑞. 脱落酸对植物库强度的调节作用. *植物生理学通讯*, 1996, 32 (3): 223~ 228