

文章编号: 1000-4025(2005) 09-1772-06

玉米胚发育过程中内源 ABA 和 GA₃ 的含量变化及其与脱水耐性形成的关系^{*}

王如玲^{1,3}, 黄 荟^{1,3}, 宋松泉^{1,3*}, 姜孝成²

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303; 2 湖南师范大学 生命科学学院, 长沙 410081; 3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 以发育的玉米胚为材料, 用酶联免疫吸附检测技术测定了玉米胚发育和脱水过程中内源 ABA 和 GA₃ 含量的动态变化, 以及它们与胚的脱水耐性形成的关系。结果表明, 玉米胚在发育过程中其 ABA 含量峰值出现在 GA₃ 含量峰值之前, 而且 ABA 峰值出现在授粉后 28 d, 晚于胚的含水量下降; 胚在脱水过程中 ABA 和 GA₃ 的含量都呈先上升后下降的变化。可以认为在脱水过程中 ABA 含量的增加是胚对脱水胁迫应激反应的结果, 有保护胚的作用; 但 GA₃ 含量增加的生理机制及其作用尚不清楚。在玉米胚的发育过程中, 内源 ABA 和 GA₃ 之间的相对平衡可能主要调控胚的发育进程和萌发力的形成; 胚的 ABA 含量变化可能不足以引起其脱水耐性的形成。

关键词: 玉米胚; ABA; GA₃; 发育; 脱水耐性

中图分类号: Q945.6; Q948.112⁺.3 文献标识码: A

Endogenous ABA and GA₃ Contents and Their Relationships with Dehydration-tolerance Formation in Embryo Development of Maize

WANG Ru-ling^{1,3}, HUANG Hui^{1,3}, SONG Song-quan^{1,3*}, JIANG Xiao-cheng²

(1 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China; 2 College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to determine the contents of endogenous ABA and GA₃ of maize embryos in their development and dehydration for studying their relationship with dehydration-tolerance formation of the embryos. The results illustrated that in the development of maize embryos, the ABA content of the embryos came to its highest point before the GA₃ content did and that its peak appeared on the twenty eighth days after pollination, which was later than the time when the water content of the embryos declined; the ABA and GA₃ contents of the embryos appeared to initially increase and then decline in their dehydration. Accordingly, the ABA increase of the embryos in their dehydration was a response to the stress of the dehydration and thus helpful to protect the embryos; but the biological mechanism and effects of the GA₃ increase were still not clear. In the development of maize em-

^{*} 收稿日期: 2005-01-26; 修改稿收到日期: 2005-07-29
基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-SW-117); 中国科学院“百人计划”; 科技部国家科技基础条件平台项目(2004DKA 30430)
作者简介: 王如玲(1979-), 女(汉族), 硕士研究生。
^{*} 通讯联系人。Correspondence to: SONG Song-quan. E-mail: sqsong@xtbg.org.cn

bryos, the balance between endogenous ABA and GA₃ in the embryos may mainly regulate the developmental progress and germinating-force formation.

Key words: maize embryo; ABA; GA₃; development; dehydration

植物激素是一类小分子活性物质,在种子生长、胚发育、贮藏物积累过程中具有重要的作用. ABA (abiscisic acid) 可以抑制早萌(也称胎萌)、诱导与贮藏物积累和脱水耐性获得有关的基因表达、抑制贮藏物的动员(reserve mobilization)、并能维持种子的休眠^[1]. 例如玉米的 ABA 缺失突变体的种子或胚在发育过程中出现早萌^[2~4], 拟南芥和番茄的 ABA 缺失突变体种子不能成熟和休眠^[5,6]. 通常,在种子发育过程中 ABA 含量呈先上升后下降的趋势^[7]; GA(gibberellin)和 ABA 的作用互相拮抗. GA 可以诱导早萌以及一些水解酶基因的表达、刺激胚乳贮藏物的动员、促进某些成熟种子的萌发和参与打破某些种子的休眠^[1,8]; 因此,GA 和 ABA 的相对平衡是控制种子发育和萌发的重要因素^[1,9].

正常性种子在发育过程中经历一个从不耐脱水到耐脱水的转变^[7],在组织分化期(histodifferentiation)之前尚没有耐脱水能力. 但不具脱水能力的种子或胚在脱水前用外源 ABA 处理可以诱导其对快速脱水的耐性^[10~14]; ABA 缺失突变体不耐脱水,外源 ABA 可以诱导其获得脱水耐性^[4]; 外源 ABA 还可以诱导愈伤组织^[15]和体细胞胚^[16,17]的脱水耐性.

关于种子发育过程中内源激素的动态变化及其作用的研究大多建立在以种子为材料的平台上,但作为生活组织的胚在大部分种子中只占非常小的一部分,因此这些研究很难避免周围结构胚乳和种皮对胚的干扰^[18]. 本实验以玉米胚为材料,对玉米胚发育和脱水过程中植物激素的含量变化及其与脱水耐性形成的关系进行研究,旨在为揭示种子脱水耐性的分子机理提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试玉米品种为北京农业大学培育的“农大108号”,于2003年11月种植在中国科学院西双版纳热带植物园苗圃中,常规管理,人工授粉. 采集授粉后不同天数的玉米种子,剥取其胚作实验材料.

1.2 脱水处理

将不同发育时期的玉米胚放在装有大量活化硅胶的干燥器中,分别脱水1、2、4、8、12和24 h.

1.3 含水量测定

将24~52 DAP (days after pollination) 的新鲜玉米胚或脱水后的胚,在103℃条件下烘17~18 h,每处理10个胚,重复4次. 含水量用 $g\ H_2O \cdot g^{-1}\ DW(g \cdot g^{-1})$ 来表示.

1.4 萌发试验

将新鲜胚或脱水处理后的胚均匀放置在盛有1%琼脂的培养皿中,每皿15个胚,重复4次,于30℃萌发5 d,以胚根伸出1 cm 计为萌发.

1.5 幼苗长度测定

胚在30℃中萌发5 d后,分别测量其胚根和胚芽的长度,计算两者之和,单位为 cm.

1.6 植物激素的提取和测定

新鲜玉米胚或脱水处理后的胚立即投入液氮中速冻,再转移到-60℃冰柜中保存备用. 用中国农业大学作物化控研究室制备的 ABA 和 GA₃ 试剂盒和 ELISA 方法对 ABA 和 GA₃ 进行提取、纯化和测定.

2 结 果

2.1 种子及其胚的发育与萌发力的获得

24 DAP 的玉米种子及其胚的干重分别为 (36.425 ± 1.36) 和 (0.428 ± 0.191) mg,随着发育进程稳步增加,44 DAP 时,种子的干重已达最大值,但胚呈继续增长的趋势(图1A);种子和胚的含水量则在发育过程中逐渐下降,当44 DAP 后,种子的含水量继续下降并低于胚的含水量,后者则趋于稳定(图1B). 22 DAP 胚尚无萌发能力,24 DAP 胚的萌发率为40%,至30 DAP 时萌发率达到100%. 但不同发育程度的胚经萌发5 d,幼苗的生长量则有差异. 38 DAP 以前的胚的幼苗鲜重随发育进程而逐渐增加,38~48 DAP 胚的幼苗鲜重大致相同,48 DAP 以后胚的幼苗鲜重随发育进程而迅速增加(图2).

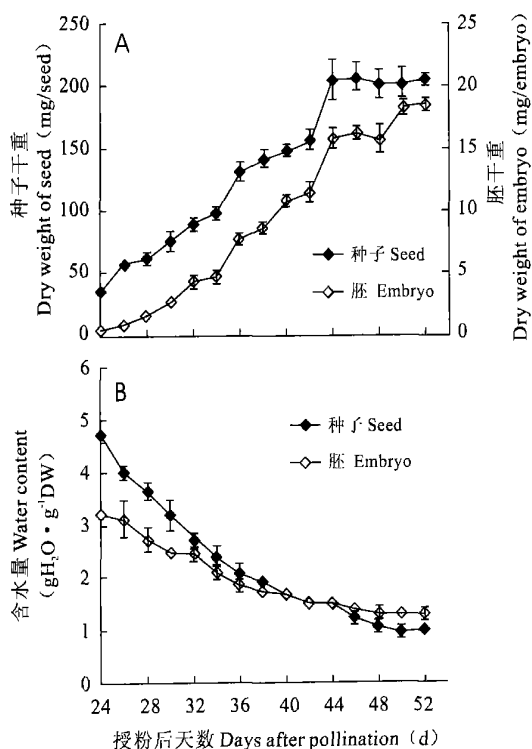


图 1 玉米种子和胚发育过程中干重和含水量的变化
A. 干重; B. 含水量

Fig. 1 Dry weights and water content of maize seeds and embryos in their development
A. Dry weight; B. Water content

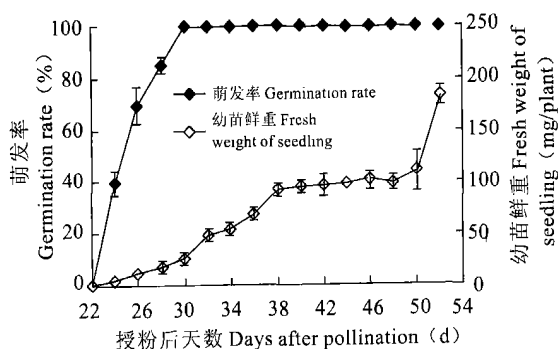


图 2 不同发育时期的玉米胚的萌发率和幼苗鲜重的变化

Fig. 2 Germination rates of maize embryos and fresh weights of maize seedlings at different development stage

2.2 玉米胚在发育过程中脱水耐性的变化

虽然发育至 24 DAP 玉米胚已具有萌发能力, 但其脱水耐性的获得要晚得多. 32 DAP 的胚在轻

度脱水后能完全萌发并形成幼苗; 进一步脱水时, 萌发率迅速下降; 当含水量脱至 $0.08 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 完全失去萌发能力. 此后随着种子发育, 胚的脱水耐性迅速提高, 44 DAP 的胚在脱水至含水量 $0.07 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 萌发率仍可达到 67.5% (图 3). 此外, 轻度脱水 (至约 $0.8 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) 还能促进胚的萌发速率, 但严重脱水则会显著延缓幼苗的生长 (结果未列出).

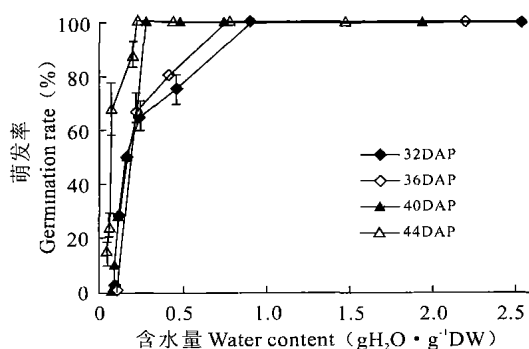


图 3 玉米胚发育过程中脱水耐性的变化
Fig. 3 Dehydration tolerance of maize embryos in their development

2.3 玉米胚在发育和脱水过程中 ABA 和 GA₃ 含量的变化

2.3.1 玉米胚发育过程中 ABA 和 GA₃ 含量的变化 24 DAP 的玉米胚内源 ABA 含量为 $563 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$, 至 28 DAP 时含量上升至 $1008 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$, 但随后迅速下降, 至 34 DAP 时下降速度较慢 (图 4A). 玉米胚在发育过程中, 其 GA₃ 含量也呈先上升后下降的变化, 但其峰值 ($616 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) 为 38 DAP, 比 ABA 的峰值推迟了 10 d, 随后才逐渐下降 (图 4B).

2.3.2 玉米胚脱水处理过程中 ABA 和 GA₃ 含量的变化 不同发育时期的玉米胚在脱水过程中, 其 ABA 含量都有一个明显的增加过程, 而且发育较早期的胚的 ABA 含量上升的峰值较高, 发育较后期的胚的 ABA 含量上升的峰值较低; 但随脱水程度加大, 均迅速下降至低于脱水前的水平 (图 5A). 在脱水过程中胚的 GA₃ 含量也呈先上升后下降的变化, 但 40 DAP 胚的 GA₃ 峰值最高, 44 DAP 胚的 GA₃ 峰值出现在脱水较严重的时期, 随后进一步脱水至某一相同低含水量时, 40 DAP 胚的 GA₃ 值仍最高, 44 DAP 胚的 GA₃ 值也维持在脱水前的水平, 但 32 DAP 和 36 DAP 胚的 GA₃ 值下降至低于脱水前的水平, 且发育时间较短的 32 DAP 胚下降的幅

度最大(图 5B).

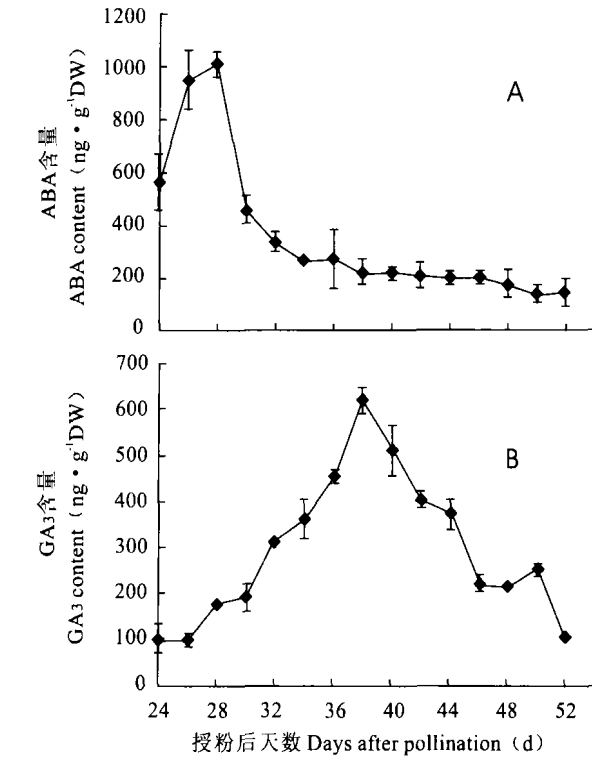


图 4 玉米胚发育过程中 ABA 和 GA₃ 含量的变化
A. ABA; B. GA₃
Fig. 4 ABA and GA₃ contents of maize embryos in their development
A. ABA; B. GA₃

3 讨论

ABA 是调节合子胚和体细胞胚早期发育最重要的一种激素^[19]. 水稻种子^[20]和玉米种子^[11]发育过程中, 其 ABA 含量都是先上升后下降. ABA 合成抑制剂 fluridone 只有在玉米种子发育早期施加才能使种子早萌; 尽管玉米母体植株可能给胚的发育提供大量的 ABA, 但其 ABA 缺失突变体的种子仍然出现早萌. 因此, 在种子发育早期, 可能需要一定量的胚源 ABA 以抑制早萌, 而在种子发育的中后期主要是由母体植株提供 ABA 或由于种子所处环境不适宜而抑制种子萌发^[1, 21]. 本研究中的玉米胚在发育过程中, ABA 含量在 28 DAP 出现峰值(图 4A), 随后下降到一个较低水平, 与上述结果一致. 在玉米种子发育过程中, GA 有诱导早萌的作用^[1]. 玉米的 ABA 和 GA 双缺失突变体的种子不出现早萌^[1]; 抑制玉米的 ABA 缺失突变体发育早期

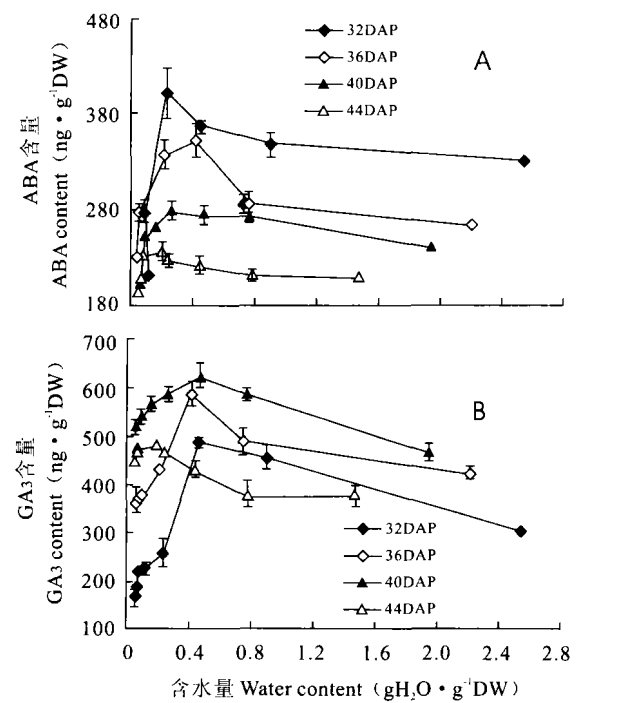


图 5 玉米胚脱水过程中 ABA 和 GA₃ 含量的变化
A. ABA; B. GA₃
Fig. 5 ABA and GA₃ contents of maize embryos in their dehydration
A. ABA; B. GA₃

GA 的合成可以抑制种子的早萌, 而外源 GA 使其恢复早萌^[22]; 在玉米、大麦和小麦种子的发育过程中, GA₃ 含量呈先上升后下降的变化模式^[1, 23]. 本研究中检测到玉米胚中 GA₃ 含量有相似的变化(图 4B). 虽然 ABA 和 GA 在调控种子萌发时相互拮抗, 但它们可以共同促进狐尾草矮壮突变体种子离体幼苗胚轴的生长^[24]. 在玉米种子发育过程中, White^[1]等发现在玉米种子中具有生物活性的 GA₃ 和 GA₁ 的峰早于 ABA 的峰出现, 因此推测种子中 ABA 和 GA 的相对平衡决定其早萌还是继续发育至成熟, 并认为 GA 峰先于 ABA 峰出现才能保证玉米种子完成正常的发育程序. 但本研究发现玉米胚在发育过程中 ABA 的峰先于 GA₃ 的峰出现, 呈现与完整种子不同的变化模式, 因此决定胚是早萌还是继续发育还可能与胚周围组织或母体植株的影响有关. 在野生型拟南芥种子中, ABA 的峰(10 DAP)要早于种子脱水耐性的获得(12~14 DAP); 而

且 21 DAP 的拟南芥 ABA 缺失和不敏感双突变体的种子的含水量远比野生型高^[25]; Finkelstein^[27]等在 *Brassica napus* 中发现 ABA 的峰要早于种子水分的丧失; 因此 Ooms^[28]等认为正常性种子在发育过程中, ABA 的一个重要功能就是启动与种子脱水耐性获得密切相关的水分丧失. 本研究发现不同发育时期的玉米胚在脱水过程中 ABA (图 5A) 和 GA₃ (图 5B) 含量都有一个明显的增加过程, 然后下降至低于或接近脱水前的水平. 但伴随 ABA 含量的增加, 玉米胚的脱水耐性并没有相应提高(图 3), 而且

正常发育的玉米胚在 24 DAP 以后含水量就一直在下降(图 1B), 脱水耐性逐渐提高, 但内源 ABA 的含量在 28 DAP 时才达到高峰, 随后呈下降的趋势(图 4A). 此外, 在脱水至较低含水量时, 发育程度越低的种子 ABA 含量的增值越大, 很显然这是非成熟种子受脱水胁迫时诱导了 ABA 的合成. 由此可以认为正常发育的玉米胚中 ABA 含量的变化可能不足以引起种子脱水耐性的形成. 在脱水过程中, 胚的 GA₃ 含量也上升则是一个有趣的现象, 其作用有待进一步研究.

致谢: 本研究得到中国科学院西双版纳热带植物园种子生物学组其他老师和同学的帮助和支持, 特此感谢!

参考文献:

- [1] WHITE C N, PROEBSTING W M, HEDDEN P, *et al.* Gibberellins and seed development in maize. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance govern germination versus maturation pathways[J]. *Plant Physiol.*, 2000, 122: 1 081– 1 088.
- [2] ROBERTSON D S. The genetics of vivipary in maize[J]. *Genetics.*, 1955, 40: 745– 760.
- [3] NEILL S J, HORGAN R, PARRY A D. The carotenoid and abscisic acid content of viviparous kernels and seedlings of *Zea mays* L. [J]. *Planta*, 1986, 169: 87– 96.
- [4] BOCHICCHIO A, VERNIERI P, PULIGA S, *et al.* Acquisition of desiccation tolerance by isolated maize embryos exposed to different conditions: the questionable role of endogenous abscisic acid[J]. *Physiologia Plantarum*, 1994, 91: 615– 622.
- [5] KOORNNEEF M, VAN DER VEEN J H. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1980, 58: 257– 263.
- [6] KOORNNEEF M, JOURNA M L, VAN DER SWAN D L C, *et al.* The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1982, 61: 385– 393.
- [7] KERMODE A R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment[A]. Galili G, Kigel J, eds. *Seed development and germination* [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1995: 273– 332.
- [8] JACOBSEN J V, GUBLER F, CHANDLER P M. Gibberellin action in germinated cereals[A]. Davies P J. 2nd edition. *Plant Hormones* [M]. Boston: Martinus Nijhoff, 1995: 246– 271.
- [9] ROCK C D, QUATRANO R S. The role of hormones during seed development[A]. Davie P J. 2nd edition. *Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology* [M]. Dordrecht: Kluwer, 1995: 671– 697.
- [10] BOCHICCHIO A, VAZZANA C, RASCHI A, *et al.* Effect of desiccation on isolated embryos of maize. Onset of desiccation tolerance during development[J]. *Agronomie.*, 1991, 8: 29– 36.
- [11] BARTELS D, SINGH M, SALAMINIS F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryos[J]. *Planta*, 1988, 175: 485– 492.
- [12] BLACKMAN S A, WETTLAUFER S H, OBENDORF R L, *et al.* Maturation proteins correlated with desiccation tolerance in soybean [J]. *Plant Physiol.*, 1991, 96: 868– 874.
- [13] BLACKMAN S A, OBENDORF R L, LEOPOLD A C. The role of lea proteins in desiccation tolerance in soybean[A]. Come D, Corbineau F, eds. *Fourth international workshop on seeds. Basic and applied aspects* [C]. Paris: ASFIS, 1993: 121– 126.
- [14] MEURS C, BASRA A S, KARSEN C M, *et al.* Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol.*, 1992, 98: 1 484– 1 493.
- [15] BARTELS D, SCHNEIDERS K, TERSTAPPEN G, *et al.* Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* [J]. *Planta*, 1990, 181: 27– 34.
- [16] SENARATNA T, MC KERSIE B D, BOWLEY S R. Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Induction of desiccation tolerance in somatic embryo[J]. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1990, 26: 85– 90.
- [17] ATTREES M, POMEROY M K, FOWKE L C. Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage[J]. *J. Exp. Bot.*, 1995, 46: 433– 439.
- [18] YANG J(杨 军), ZHAO J(赵 洁), ZHOU X(周 燮), *et al.* Fluctuations of endogenous hormones in isolated rice embryos during embryogenesis and early stages of germination[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2003, 45(6): 705– 711(in Chinese).

[19] 李宗霆,周 燮.植物激素及其免疫检测技术[M]. 南京: 江苏科学出版社, 1996.

[20] ALDRIDGE C D, PROBERT P R J. Seed development, the accumulation of abscisic acid and desiccation tolerance in the aquatic grasses *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka and *Oryza sativa* L. [J]. *Seed Sci. Res.* , 1993, 3: 97– 103.

[21] FONG F, SMITH J D, KOEHLER D E. Early events in maize seed development: 1-methyl-3-phenyl-5-(3-(trifluoromethyl) phenyl) -4-(1-H)-pyridinone induction of vivipary[J]. *Plant Physiol.* , 1983, 73: 899– 901.

[22] WHITE C N, RIVIN C J. Gibberellins and seed development in maize. . Gibberellin synthesis inhibition enhance abscisic acid signaling in cultured embryos[J]. *Plant Physiol.* , 2000, 122: 1 089– 1 097.

[23] JACOBSEN J V, CHANDLER P M. Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals[A]. Davies P J, eds. Plant hormones and their role in plant growth and development[M]. Boston: Martinus Nijhoff, 1987: 246– 271.

[24] CHEN J G, ZHOU X. Involvement of abscisic acid in mesocotyl growth in etiolated seedlings of foxtail millet dwarf mutant[J]. *J. Plant Growth Regul.* , 1998, 17: 147– 151.

[25] KARSEN C M, BRINKHORST-VAN DER SWAN D L C, BREEKLAND A E, *et al.* Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotype of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. *Planta*, 1983, 157: 158 – 165.

[26] KOORNNEEF M, HANHART C J, HILHORST H. *et al.* *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol.* , 1989, 90: 463– 469.

[27] FINKELSTEIN R R, TENBARGE K M, SHUMWAY J E, *et al.* Role of ABA in maturation of rapeseed embryos[J]. *Plant Physiol.* , 1985, 78: 630– 636.

[28] OOMS J J J, VAN DER VEEN R, KARSEN C M. Abscisic acid and osmotic stress or slow drying in dependently induce desiccation tolerance in mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Physiol. Plant*, 1994, 92: 506– 510.

封面植物简介——金钱槭

金钱槭(*Dipteronia sinensis* Oliv.) 隶属于槭树科金钱槭属, 为中国特有的寡种属植物之一。金钱槭为落叶乔木, 高可达 10 m, 具裸露的冬芽。奇数羽状复叶对生, 通常具 7~11 枚小叶。花白色, 杂性, 雄花与两性花同株, 形成圆锥花序。翅果周围环绕着圆形的翅, 嫩时粉红色, 成熟时棕黄色, 状如古钱。金钱槭分布于陕西、甘肃、湖北、河南、四川、贵州等省, 被列为中国三级保护植物。它对于研究槭树科植物的系统演化及中国植物区系具有重要意义。金钱槭宜栽培, 可引种为行道树或庭园绿化树。

(黎斌提供文、照片)

Introduction of the Plant Front Cover *Dipteronia sinensis* Oliv. (Aceraceae)

Dipteronia sinensis Oliv., of the genus *Dipteronia* Oliv. (Aceraceae), is deciduous trees with naked winter buds, up to 10 m in height. The compound leaves are odd-pinnate and opposite with 7 ~11 leaflets. The flowers are white and polygamous and form a terminal or axillary panicle. The samaras are coin-shaped and with encircling orbicular or ovate wings, pink at developing and yellowish at maturity. *D. sinensis* Oliv. is distributed mainly in Shaanxi, Gansu, Hubei, Henan, Sichuan and Guizhou. *D. sinensis* Oliv., endemic to China, is a member of the obligospecific genus and has a peculiar fruit. It is of considerable interest in the study of the origin and evolution of Aceraceae and in the study of the Chinese flora. *D. sinensis* Oliv. is one of the rare species in China and has ranked as the third grade of National Protected Plants. *D. sinensis* Oliv. is easy to culture on two side of the street and in the courtyard because of the beautiful form of the tree.

(Photographer and Paper Supplier: LI Bin)