

番茄花药愈伤组织诱导中脯氨酸含量变化的研究

张永华, 辛建华, 苑育文

(新疆石河子大学农学院园艺系 832000)

摘要: 通过接种在两种不同激素浓度培养基上的花药进行培养得到的不同愈伤组织, 进行游离脯氨酸的测定, 结果表明: 愈伤组织的游离脯氨酸含量始终高于胚性愈伤组织的含量, 说明游离脯氨酸在愈伤组织形成过程中起重要作用。

关键词: 加工番茄; 花药; 愈伤组织; 胚性愈伤组织; 游离脯氨酸

中图分类号: S 641.203.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)06-0015-02

加工番茄是茄科(Solanoideae)番茄属(*lycopersicon*)的栽培型亚种, 适应范围广、产量高, 富含维生素类和糖类, 以及在消费领域中有较广的用途。但是近年来加工番茄品种退化严重, 抗病虫能力急剧下降, 影响了番茄的质量。进行番茄花药培养可以为转基因技术在番茄育种上应用提供了良好的载体, 适合对现有品种进行有限的修饰和改良, 特别是品质改良^[1]。花药培养技术在白菜、油菜、芥菜、黑麦、小麦的品质育种中都取得了一定的成效^[2~4]。该试验旨在分析同一基因型番茄花药愈伤组织形成过程中的脯氨酸含量的变化关系, 为花药培养技术应用于加工番茄品质改良作一些有益的尝试, 以期在今后的研究中服务于加工番茄品质育种。

1 材料与方法

1.1 供试材料

新疆主栽品种加工番茄“里格尔 87—5”品种, 2006 年 4 月开始取花粉粒处于单核靠边期的花药进行离体诱导, 获得愈伤组织, 取不同培养时期的愈伤组织进脯氨酸含量分析。

1.2 离体花药诱导愈伤组织

取加工番茄花粉粒处于单核靠边期的花药(镜检检验发育时期)^[5,6]在 4℃下预处理 48h 后, 接种于 MS 培养基, 以附加 2, 4-D 0.2mg/L + KT1.5mg/L 为 1 号培养基, 附加 2, 4 -D 0.4mg/L + KT1.0mg/L 为 2 号培养基, 均添加蔗糖 35g/L, 琼脂 6g/L, pH 值为 5.8。接种密度 20~30 枚/50mL 三角瓶。每个处理设 3 次重复, 每

次重复至少接种 10 瓶约 200~300 枚花药。培养温度为 34℃~35℃黑暗培养一周, 然后转至 26℃±1℃培养箱暗培养, 长出愈伤组织后于光照培养箱中培养, 光照 12h, 光强 12 000Lx。

1.3 游离脯氨酸的测定

游离脯氨酸采用磺基水杨酸法^[8]测定: 脯氨酸的提取: 准确称取不同处理的待测植物叶片各 0.5g, 分别置于大管中, 然后向各管分别加入 5mL 3%的磺基水杨酸溶液, 在沸水浴中提取 10min (提取过程中要经常摇动), 冷却后过滤于干净的试管中, 滤液即为脯氨酸的提取液; 吸取 2mL 提取液于另一干净的带玻塞试管中, 加入 2mL 冰醋酸及 2mL 酸性茚三酮试剂, 在沸水浴中加热 30min, 溶液即呈红色; 冷却后加入 4mL 甲苯, 振荡 30s, 静置片刻, 取上层液至 10mL 离心管中, 在 3 000rpm 下离心 5min; 用吸管轻轻吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液于比色杯中, 以甲苯为空白对照, 分光光度计上在 520nm 波长处比色, 求得吸光度值。从标准曲线上计算样品中脯氨酸含量的百分数。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织形成情况

接种在两种不同激素浓度培养基上的花药进行培养, 并多次继代于同种培养基上, 分别对培养 14、21、28、35、42d 的材料进行观察, 结果如表 1 所示。

表 1 不同激素条件下番茄花药愈伤组织生长情况

培养基	培养天数	14d	21d	28d	35d	42d
1 号	花药膨大, 稍微变褐	花药基部变黄, 乳白带淡色绿, 淡黄色带绿	开始出现晶白点, 湿润的愈伤点, 质地较软	愈伤组织	黄绿色, 抽出小芽和白根	
	花药膨大, 稍微变褐	花药基部变黄, 愈伤组织疏松, 愈伤组织不	出现白色愈伤组织, 瘤状突起变淡	同程度的褐化	瘤状突起	现芽元基

从表 1 中可以看出, 1 号培养基形成一般愈伤组织并进一步分化出现小芽和白根, 2 号培养基可以形成胚

第一作者简介: 张永华(1980-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事现代蔬菜育种研究, E-mail: yonghua100@163.com.
通讯作者: 辛建华(1968-), 男, 河南洛阳人, 副教授, 主要从事蔬菜抗病虫遗传育种研究, E-mail: xjhfb1@vip.sina.com.
收稿日期: 2007-01-10

性愈伤组织, 并行成芽原基。由 1、2 号培养基可以看出愈伤组织直接生成体胚与诱导愈伤组织脱分化形成器官乃至完整植株是两种完全不同的植物形态建成途径, 所需要的培养环境迥然相异。

2.2 游离脯氨酸的测定

图 1 中可以看出, 愈伤组织中的游离脯氨酸开始积累的较早, 而且含量随着愈伤组织的生长不断增加, 当愈伤组织长到 28d 时达到最大值, 以后随着愈伤组织的继续分化, 含量迅速下降, 最后基本达到平衡。而胚性愈伤组织脯氨酸含量总体呈下降趋势, 在培养 28d 时, 由于愈伤组织开始退化, 游离脯氨酸含量下降加快, 随着瘤状突起的生长, 培养 35d 时, 稍微有所增加, 但以后仍呈下降趋势。在花药培养过程中, 愈伤组织的脯氨酸含量始终高于胚性愈伤组织的含量。

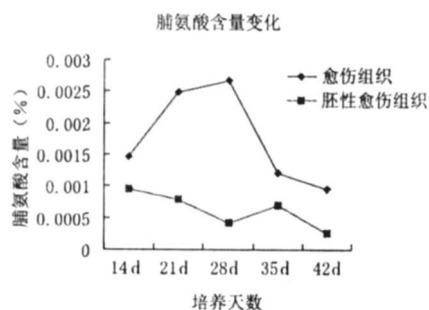


图 1 愈伤组织和胚性愈伤组织中脯氨酸含量

3 讨论

愈伤组织直接生成体胚与诱导愈伤组织脱分化形成器官乃至完整植株是两种完全不同的植物形态建成途径, 所需要的培养环境和内部生理机制也迥然相异。

在高等植物的发育过程中游离氨基酸不仅是细胞渗透调节因子和蛋白质合成的前体物, 而且也是控制自身代谢程序和改变相关基因表达的信号分子^[9~11]。陈克贵和朱庆麟报道了外加脯氨酸能刺激小麦愈伤组织苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性, 促进苯丙烷代谢, 有利于

愈伤组织中形成导管系统, 促进植株的分化, 同时愈伤组织中游离氨基酸总量增加了 72%^[12, 13]。试验研究也表明, 愈伤组织中游离脯氨酸含量与绿苗分化率之间存在直接的联系。愈伤组织中游离氨基酸的成分对愈伤的分化以及发育具有较大的影响^[14]。具体的机理尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Foroughi-Wehr B, Friedt W. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum Vulgare* lines by anther culture [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1984, 67: 377-382.
- [2] 蒋武生, 耿建峰. 基因型和有机附加物对小白菜花药培养胚状体诱导的影响 [J]. *中国瓜菜* 2006 (2): 1-4.
- [3] 黄志仁, 吕超, 陈得辉, 等. 大麦高赖氨酸的遗传研究 II 大麦赖氨酸含量与胚比及千粒重的相关 [J]. *作物学报* 2002, 22(4): 19-22.
- [4] 范士靖, 李建粤, 张国荣, 等. 高蛋白、高赖氨酸大麦的筛选及遗传距离分析 [J]. *上海农业学报* 2002 18(1): 29-34.
- [5] 王连铮, 王金陵. 大豆遗传育种学 [M]. 北京: 科学出版社 1992: 409.
- [6] 叶兴国, 王连铮. 大豆花药愈伤组织的分化及其内源激素分析 [J]. *作物学报* 1997, 23(5): 555-561.
- [7] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社 1999: 12.
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社 2000: 7: 258-260.
- [9] Zhu XH, Galii. Increased Lysine Synthesis Coupled with a Knockout of Its Catabolism Synergistically Boosts Lysine Content and Also Transregulates the Metabolism of Other Amino Acids in *Arabidopsis* Seeds [J]. *The plant cell* 2003, 15: 845-853.
- [10] Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi K, et al. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is up regulated by proline and down regulated by dehydration in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell* 1996, 8: 1323-1335.
- [11] Nielsen T H, Krapp A, Rjper-Schwartz U, et al. Sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase and is modified by the phosphate and nitrogen [J]. *Plant Cell and Environment* 1998, 21: 443-454.
- [12] 陈克贵, 朱庆麟. 脯氨酸对小麦愈伤组织生长的促进效应 [J]. *西北植物学报* 1991, 11(2): 134-137.
- [13] 陆燕鹏, 万邦惠. 脯氨酸与丙氨酸对光温敏核不育水稻愈伤组织诱导的影响 [J]. *华南农业大学学报* 1997, 8(4): 12-15.

Study of Free Proline in Processing Tomato Anther Callus

ZHANG Yong-hua, XIN Jian-hua, YUAN Yu-wen

(Department of Horticulture College of Agriculture, Shihezi University, Xinjiang 832000)

Abstract: Different callus of the anther in processing tomato was induced into two mediums with indifferent phytohormones and total content of free proline was measured in the callus and embryoid-callus. The results indicated that, total content of free proline in callus is higher than embryoid-callus'. It's also made out that free proline played an important role in the process of callus.

Key words: Processing tomato; Anther; Callus; Embryoid-callus; Free proline