

DOI:10.11937/bfyy.201524020

番茄活体再生中反式玉米素含量的变化

曹慧颖, 张立军, 骆 祯, 刘玲莉, 孙建坤, 夏润玺

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以番茄活体植株为试材,采用高效液相色谱(HPLC)法研究了番茄活体再生中反式玉米素含量的变化。结果表明:在愈伤组织的形成过程中,反式玉米素逐渐增加,并且在愈伤组织最发达时达到峰值。随着愈伤组织分化,其含量略有降低。此变化规律与番茄离体再生中外源反式玉米素使用浓度由高到低的变化规律基本吻合。活体再生中,用细胞分裂素合成抑制剂洛伐他丁处理伤口不影响再生进程。

关键词:细胞分裂素;HPLC;再生机理;番茄

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0066-04

番茄(*Solanum lycopersicum* L.)是茄科的模式植物,其再生体系不仅可以在生产上实现快速无性繁殖,而且也是开展植物基因工程研究的前提和基础。番茄除了传统的离体再生体系,目前还建立了活体再生体

系^[1-3]。活体再生直接发生在番茄活体植株的伤口上,发育进程与离体再生完全相同。此过程不需要外源激素,能够直接反映植物对再生进程的调控,因此活体再生可以作为研究植物再生机理的模式系统。

激素对于调节植物的生长发育至关重要。在植物组织培养的实践中,通常也是利用外源激素诱导外植体的再生。外源激素的作用机理可能是影响了内源激素的合成和分配^[4],因此,了解番茄活体再生过程中内源激素含量的动态变化,对于揭示激素调控植物再生的机理具有重要意义。

研究表明,只用玉米素一种外源激素可使离体培养

第一作者简介:曹慧颖(1975-),女,博士,讲师,现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail:497110804@qq.com.

责任作者:夏润玺(1972-),男,博士,讲师,现主要从事分子生物学等研究工作。E-mail:xiarunxi@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300164);教育部博士学科点专项科研基金资助项目(20122103120004)。

收稿日期:2015-09-28

[15] 杨风云.城市土壤对园林树木的影响分析[J].湖北农业科学,2009(3):590-591.

[16] 李玉和.城市土壤密实度对园林植物生长的影响及利用措施[J].中国园林,1995(3):41-43.

[17] 吴新民,李恋卿,潘根兴,等.南京市不同功能城区土壤中重金属Cu、Zn、Pb和Cd的污染特征[J].环境科学,2003,24(3):105-111.

[18] HAUSER R J, MILLER R W, OUMET D M. Street tree decline and construction damage[J]. Journal of Arboriculture, 1994, 20(2): 94-97.

Reflections on the Design and Construction of Tree Pool

FENG Jing, SHEN Yongbao

(Co-innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: The process of tree pool construction and application has impact on growth of trees. In this paper, some useful methods, such as survey visit, theoretical summary, and examples of analysis, were available to research on tree pool. The emphasis of this paper was studying on the relationship between tree pool and growth of trees. Through analysis, the environment in tree pool in terms of temperature, moisture, soil aeration and soil fertility were more serious, and the degree of tree pool harsh environment was vary from different urban green space, tree pool of street trees environment was the worst. From the formal analysis, the high tree pool was much worse than the flat tree pool on trees health. Mainly reflected in, 1) Abnormal growth of the roots around the tree wall; 2) Temperature changes obviously, large temperature difference between day and night; 3) Lead to shallow root distribution, weak wind resistance. In addition, construction and underground pipelines had a certain impact on tree pool trees in an indirect way.

Keywords: tree pool; tree; root system; growth and development

的番茄组织高频再生^[5-8],说明玉米素对于番茄离体再生具有重要调控作用。但玉米素是否调控活体再生进程仍是未知。该研究利用高效液相色谱测定了番茄活体再生中反式玉米素含量的动态变化,为深入研究植物再生机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄种子为“辽园多丽”种子,催芽后播种入土,待幼苗3~4片叶时单株分盆移栽,在23~28℃、16 h光照条件下培养。植株长出6~8片叶时选取健康植株,作为供试活体植株。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄活体再生体系的诱导 选取健康植株,水平去头剔除生长点。此后腋芽迅速萌发,一旦发现肉眼可见的腋芽,立即剔除,从而诱导顶端去头伤口处形成愈伤组织,并萌发丛生芽。

1.2.2 反式玉米素的提取 分别在番茄去头后第0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30天,切取植株顶端2 mm组织,准确称量后,用液氮速冻,−80℃保存。测定前,样品经冰浴研磨后,加入−20℃预冷的80%甲醇30 mL,4℃浸提过夜,于4℃ 12 000 r/min离心20 min,取上清液。残渣用80%甲醇10 mL于4℃浸提2 h,12 000 r/min离心20 min,取上清液。合并2次离心上清液,在60℃水浴下浓缩至约5 mL,加入饱和石油醚(体积比1:1)萃取,至有机相无色。60℃水浴浓缩至1 mL,经0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液经活化 Sep-pak C18 固相萃取小柱纯化,收集洗脱液定容至1 mL,过0.45 μm滤膜后备用。

1.2.3 固相萃取柱的活化和洗脱方法的确定 固相萃取是植物激素提取、纯化的一个有效手段。它的原理是样品上柱后将激素保留在C18柱上,并尽量减少干扰杂质的存留,选择合适的溶剂将干扰杂质淋洗掉,然后再用另一溶剂把激素从固定相上洗脱下来^[4]。根据报道,游离态激素在pH 3.0时与C18小柱具有极强的吸附能力^[9],一些研究C18小柱使用前先用甲醇活化,再用pH 3.0的水平衡^[9-11]。然而也有研究样品过柱前并未用

pH 3.0水平衡小柱^[12-13]。分别将 Sep-pak C18 小柱用2 mL 80%甲醇活化,以及小柱用2 mL 80%甲醇活化后再用1 mL pH 3.0的乙酸水溶液活化。随后上样含0.1 mg/mL反式玉米素的10%甲醇溶液1 mL,HPLC测定C18小柱的流出液中反式玉米素的含量,从而确定最佳的固相萃取柱活化方法。C18小柱活化后,分别上样0.1 mg/mL的反式玉米素标样,弃去流出液,分别用10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%的甲醇各3 mL洗脱,收集洗脱液,进行HPLC测定反式玉米素回收率。随后,将1 g番茄愈伤组织的提取物过C18小柱,洗脱液进行HPLC分析,根据反式玉米素的回收率及目标峰与杂质峰的分离情况确定固相萃取柱的洗脱方法。

1.2.4 洛伐他丁(Lovastatin)对活体再生的影响 将洛伐他丁溶于少量甲醇后,用蒸馏水定容至50 mg/mL,−20℃保存。使用时稀释1 000倍,并添加1滴吐温-20。将20 μL洛伐他丁溶液涂抹于去头番茄植株伤口,共10株,并做空白对照,观察再生情况。

1.3 项目测定

使用Agilent 1100液相色谱仪、Agilent C18反相色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),根据1.2.3中确定的条件,采用外标法进行反式玉米素的高效液相色谱分析。反式玉米素标准品购于Sigma公司。流动相为甲醇:水=25:75,柱温为35℃,流速为1 mL/min,进样量20 μL,检测波长274 nm。结果中各内源激素含量数值为3次平行样的均值。

2 结果与分析

2.1 番茄活体再生

番茄植株去头去腋芽后,茎尖伤口表面的一层细胞失水枯死,形成一薄层白色硬皮。随着不断剔除新生腋芽,伤口处逐渐长出嫩绿色的愈伤组织。愈伤组织结构紧密,最大直径可达1 cm。愈伤组织进入分化期后,表面出现大量紫色小点,最终分化形成多个再生芽(图1)。在25℃时,从去头到肉眼可见丛生芽大约需30 d。无论是在番茄的营养生长期,还是在已经开花的生殖生长期,去头去腋芽均可实现活体再生,但幼嫩植株的再生能力更强。



注:A,去头的番茄主枝;B,主枝伤口的愈伤组织;C,愈伤组织萌发的丛生芽。

Note:A,cut surfaces of tomato stems;B,callus of cut stems;C,regenerated shoots.

图1 番茄活体再生

Fig. 1 Tomato regeneration *in vivo*

2.2 固相萃取柱的活化和洗脱条件的确定

分别用不同方法活化 C18 小柱,结果显示,小柱用 2 mL 80% 甲醇活化,流出液中反式玉米素含量为 11.3%;小柱用 2 mL 80% 甲醇活化后再用 1 mL pH 3.0 的乙酸水溶液活化,流出液中反式玉米素含量为 2.98%,因此固相萃取柱使用前用 pH 3.0 乙酸水溶液活化可以减少反式玉米素纯化时的损失。

该试验用不同浓度的甲醇作为洗脱剂,从表 1 可以看出,当甲醇浓度达到 40% 以上时,反式玉米素都可以获得较高回收率。随后,将 1 g 番茄愈伤组织的提取物上 C18 小柱,再用 40% 以上的甲醇洗脱,发现 50% 以上的甲醇洗脱时,一部分色素杂质也会被洗脱,HPLC 测定时杂峰与目标峰不易分离。因此综合考虑,选取固相萃取的洗脱剂为 45% 的甲醇。反式玉米素标样与番茄样品的 HPLC 图谱见图 2、3。

表 1 C18 小柱的最佳甲醇洗脱浓度

Table 1	Optimization of methanol concentration in C18 SPE column							%
甲醇浓度 Methanol concentration	10	20	30	40	50	60	70	80
回收率 Recovery ratio	56.3	74.4	89.7	94.5	96.3	97.8	97.6	98.1

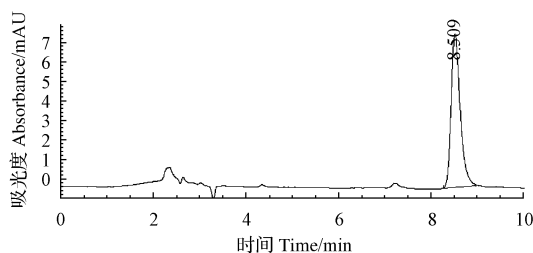


图 2 反式玉米素标样的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC profiles of trans-zeatin standard

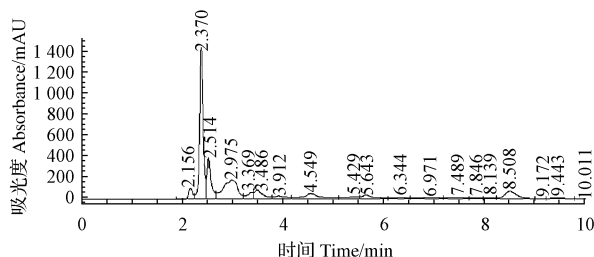


图 3 番茄样品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC profiles of *Solanum lycopersicum* L.

关于洗脱剂中是否要加酸的问题,HOU 等^[14]发现不加酸的甲醇比加了少量酸(1%甲酸)的甲醇具有更好的洗脱效果,同时符继红等^[4]也认为在酸性甲醇中植物激素的电中性在反相 C18 上更强,更难洗脱,因此该试验的洗脱剂也采用了只用醇不加酸的方式。但无论是上样还是洗脱,过 SPE 柱的流速不能太快,否则会因未达到分配平衡,影响分离效果。

2.3 标准样品的回归方程和相关系数

将配制好的系列浓度梯度的反式玉米素标准品溶液,按所选择的色谱条件进样 20 μ L,获得不同浓度时的峰面积。用峰面积(y)对标品浓度(x, pg/mL)绘制标准工作曲线。线性方程为 $y=0.0651x-3.3111$,相关系数 0.9963。

2.4 活体再生中反式玉米素含量的动态变化

将实际样品用上述固相萃取条件进行纯化然后 HPLC 测定,测定结果用标准曲线换算成原样中反式玉米素的含量。从图 4 可以看出,反式玉米素在番茄去头的茎干中检测不到。以后新生腋芽不断剔除,顶端伤口愈伤组织逐渐形成时,反式玉米素含量逐渐增加。在 24 d,愈伤组织已经十分发达,此时反式玉米素含量达到最高。随后愈伤组织开始分化,反式玉米素含量逐渐降低。反式玉米素是细胞分裂素,其主要作用是促进细胞分裂、组织增大、产生愈伤组织。反式玉米素在愈伤组织的形成过程中开始增加并且在愈伤组织最发达的时候达到峰值,说明其在细胞的脱分化、愈伤组织发育及再分化中发挥着重要作用。

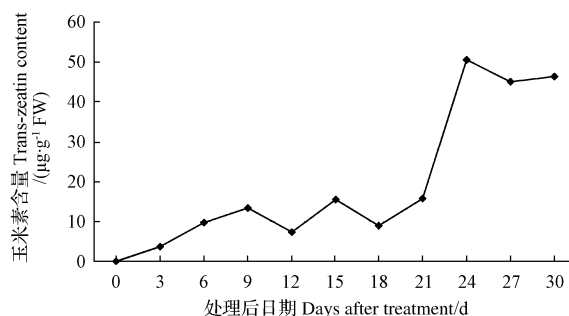


图 4 番茄原位再生不同时期反式玉米素含量的动态变化

Fig. 4 Zeatin content in tomato regeneration *in vivo*

2.5 洛伐他丁对番茄原位再生的影响

去头番茄伤口涂抹洛伐他丁后,与直接去头的番茄伤口相比,无论是再生能力及发育时间均没有差异。洛伐他丁是细胞分裂素合成抑制剂^[15],施加洛伐他丁后没有影响番茄原位再生,说明该处理没有影响伤口处的细胞分裂素含量,由此推断原位再生所需的细胞分裂素是由植物的其它部分合成后运输至伤口处,而不是直接在伤口处合成。

3 讨论

番茄的活体再生是发生在活体植株伤口上的再生,此过程不需要外源激素的调控,完全由植物自身的调控完成。但活体再生和外植体的离体再生一样,经历了愈伤组织形成及丛生芽分化过程^[1]。番茄离体再生在新品种繁育、生理学研究、遗传转化、功能基因组学研究等领域具有重要作用,因此活体再生也具有理论和实践意义。

在番茄离体再生中,已多有报道仅使用反式玉米素作为外源激素即可^[5-8],可见反式玉米素对于番茄组培再生具有重要作用。在愈伤组织诱导过程中通常使用较高的浓度 1.0~1.5 mg/L,在分化诱导中使用较低浓度约 0.1 mg/L。外源反式玉米素使用浓度由高到低的变化和活体再生中内源反式玉米素含量先升高再降低的变化规律基本吻合。同时活体再生测定的内源反式玉米素含量在 0~0.5 mg/kg,与离体再生激素使用浓度的数量级相同,但略低于离体再生。与大豆、玉米等作物相比,番茄的组织培养比较容易,再生频率较高,这些可能得益于人们已经精确的摸索到了再生所需的激素种类及浓度。

尽管在番茄活体再生中内源反式玉米素含量呈现了从无到有的变化,但伤口表面施加洛伐他丁后并未抑制活体再生的进程,说明玉米素的合成并未发生在愈伤组织内部,这就解释了离体再生对外源激素的依赖性。现在研究认为细胞分裂素只能在特定的组织和细胞合成,因此,必须通过扩散或主动运输的方式运输到靶位细胞才能正确行使功能^[16]。目前关于细胞分裂素的转运机制了解甚少,关于细胞分裂素对活体再生的调控也需深入研究。

参考文献

- [1] 曹慧颖,王玉莹,孙建坤,等. 番茄 micro-TOM 活体再生体系的建立[J]. 中国蔬菜,2014,1(12):27-29.
- [2] TEZUKA T, HARADA M, JOHKAN M, et al. Effects of auxin and cytokinin on *in vivo* adventitious shoot regeneration from decapitated tomato plants[J]. Hort Science, 2011, 46(12):1661-1665.
- [3] JOHKAN M, MORI G, MITSUKURI K, et al. *In vivo* shoot regeneration promoted by shading the cut surface of the stem in tomato plants[J]. Hort Science, 2008, 43(1):220-222.
- [4] 符继红,孙晓红,王吉德,等. 植物激素定量分析方法研究进展[J]. 科学通报,2010,55(33):3163-3176.
- [5] SUN H J, UCHII S, WATANABE S, et al. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(3):426-431.
- [6] 曹慧颖,郭三堆. 人乳铁蛋白基因在番茄中的优化表达[J]. 园艺学报,2005,32(6):1030-1033.
- [7] 曹慧颖,张锐,郭三堆. 串联的人胸腺素 $\alpha 1$ 基因在番茄中的高效表达[J]. 中国农业科学,2009,42(7):2291-2296.
- [8] EHLERT B, SCHOTTLER M A, TISCHENDORF G, et al. The para-mutated SULFUREA locus of tomato is involved in auxin biosynthesis[J]. J Exp Bot, 2008, 59(13):3635-3647.
- [9] 王洁,李敏,张宜辉,等. HPLC 测定木槿繁殖器官内源 ABA 和 GA_3 含量[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2008,47(5):752-756.
- [10] 赵晓菊,唐中华,郭晓瑞,等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定长春花中的 3 种内源激素[J]. 色谱,2006,24(5):534.
- [11] 简利茹,李哲斐,韩青梅,等. 固相萃取-HPLC 测定外生菌根真菌产生植物激素 IAA 和 GA_3 [J]. 西北农业学报,2011,20(9):165-168.
- [12] 马海燕,王美丽,张震文. 葡萄新梢生长过程中内源激素含量的动态变化[J]. 西北农业学报,2007,16(4):177-179.
- [13] 王永良,王平,王趁义. 固相萃取-高效液相色谱法测定马尾松组织中内源激素[J]. 分析科学学报,2010,26(5):547-550.
- [14] HOU S, ZHU J, DING M, et al. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2008, 76(4):798-802.
- [15] SPADAFORA N D, PARFITT D, MARCHBANK A, et al. Perturbation of cytokinin and ethylene-signalling pathways explain the strong rooting phenotype exhibited by Arabidopsis expressing the *Schizosaccharomyces pombe* mitotic inducer, *cdc25* [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(45):45.
- [16] 邓岩,王兴春,杨淑华,等. 细胞分裂素:代谢、信号转导、交叉反应与农艺性状改良[J]. 植物学通报,2006,23(5):478-498.

Change of Trans-zeatin in Tomato Regeneration *in vivo*

CAO Huiying, ZHANG Lijun, LUO Zhen, LIU Lingli, SUN Jiankun, XIA Runxi

(College of Biological Science and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Taking tomato plant as material, change of trans-zeatin *in vivo* was researched by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the content of trans-zeatin increased gradually with the formation of callus, and became peak in well-developed ones. When callus differentiated, the content decreased lightly. The content of trans-zeatin variation of regeneration *in vivo* was identical to *in vitro*. Lovastatin which could suppress the biosynthesis of cytokinins smeared in the cut surfaces could not impress the regeneration of tomato *in vivo*.

Keywords: cytokinin; HPLC; regeneration mechanism; tomato