

抗赖氨酸加苏氨酸 莲体细胞变异体的筛选

李中奎 刘成运 卢大炎

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

摘要 对籽莲红花建莲 (*Nelumbo nucifera* cv. Honghuajianlian) 和白心湘莲 (*N. nucifera* cv. Baixinxianglian) 杂交而成的幼胚的子叶、胚轴及幼胚叶(芽)形成的愈伤组织, 施以赖氨酸加苏氨酸胁迫培养 30 天, 从中筛选出抗性愈伤组织并形成再生植株。低浓度的赖氨酸加苏氨酸促进愈伤组织的生长, 而高浓度的赖氨酸加苏氨酸则抑制愈伤组织生长, 直至具有致死作用, 这种致死作用是因为高浓度的赖氨酸加苏氨酸抑制了天冬氨酸合成途径中的天冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶造成的, 细胞发生变异后对赖氨酸和苏氨酸产生了抗性, 即与天冬氨酸合成途径有关的氨基酸增加。抗性愈伤组织与未胁迫的愈伤组织的氨基酸测定表明, 在总计 17 种氨基酸中, 抗性愈伤组织有 14 种氨基酸含量超过原始愈伤组织, 1 种持平, 2 种不及原始愈伤组织。再生抗性植株的莲籽氨基酸测定显示, 在 17 种氨基酸中, 有 12 种超过母本红花建莲, 15 种超过父本白心湘莲。

关键词 莲; 体细胞无性变异系; 氨基酸

Selection of somaclonal variants of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) by lysine plus threonine stressing Li Zhong-Kui, Liu Cheng-Yun, Lu Da-Yan (Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074), *J. Plant Resour. & Environ.* 1998, 7(1): 15~19

Callus induced from young embryos hybridized by *Nelumbo nucifera* cv. Honghuajianlian \times *N. nucifera* cv. Baixinxianglian were stressed by lysine plus threonine for 30 days. Resistant callus had been selected *in vitro* and regenerated into plants. Results showed that low concentration of lysine plus threonine could promote the growth of callus, whereas high concentration prohibited their growth, even lethal to callus. Determination of amino acids of resistant callus showed that of all 17 amino acids, 14 more than, 1 equal to and 2 less than those in normal callus. Amino acid analysis of seeds of variant indicated that of all 17 amino acids, 12 in variant was more than in *N. nucifera* cv. Honghuajianlian and 15 in them was more than those in *N. nucifera* cv. Baixinxianglian.

Key words lotus; *Nelumbo nucifera* Gaertn.; somaclonal variants; amino acid

莲是古老的具有某些单子叶植物特征的双子叶植物, 其在植物分类与系统演化中的地位非常重要。莲的繁殖方式以无性繁殖为主, 而常规育种则主要依靠有性杂交的方式进行^[1]。莲的组织培养已见报道^[2-4], 利用组织培养筛选各种突变体是近来植物遗传育种的引人注目

• 中国科学院“八五”重点项目资助课题(KS85-301-02)

李中奎: 男, 1963年10月生, 硕士, 副研究员, 主要研究方向: 生物技术。

收稿日期 1997-09-21

的领域之一。实验表明,在离体条件下提高游离氨基酸的浓度可以产生某些氨基酸及其类似物生长抑制的突变体,这些突变体可以产生比对照含量高的氨基酸,借以达到提高作物品质的目的。这在烟草^[2]、玉米^[3,4]和大麦^[5]中均已实现。在植物中,天冬氨酸合成途径中的天冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶分别受赖氨酸和苏氨酸的反馈抑制^[6],利用这一原理,作者对莲愈伤组织进行了筛选。

1. 材料与方 法

1.1 实验材料

所用材料为本所保存的莲种质。曾对 102 个莲品种的花药、未授粉的子房、胚珠进行培养,均未成功。莲组织培养受基因型影响很大,许多品种对培养不敏感,通过大量试验,用红花建莲 (*Nelumbo nucifera* cv. Honghuajianlian) 作母本,以白心湘莲 (*N. nucifera* cv. Baixinxianglian) 的花粉授粉,之后套上塑料袋,以防混交。授粉后 6~10 d 取幼胚用 HgCl_2 灭菌后切割,以子叶、胚轴及幼胚叶(芽)作为外植体。

1.2 培养基

诱导培养基: MS+ZT 4 mg/L+NAA 2 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L。筛选培养基中加入过滤灭菌的赖氨酸及苏氨酸,无菌条件下分装到三角瓶中。共分 6 组:0 组为对照,不加入赖氨酸及苏氨酸,其余 5 组加入的赖氨酸及苏氨酸浓度分别为:1 组:lys 0.34 mmol/L (0.5 g/L) + thr 0.42 mmol/L (0.5 g/L);2 组:lys 0.67 mmol/L (1 g/L) + thr 0.84 mmol/L (1 g/L);3 组:lys 1.35 mmol/L (2 g/L) + thr 0.84 mmol/L (1 g/L);4 组:lys 2.70 mmol/L (4 g/L) + thr 0.84 mmol/L (1 g/L);5 组:lys 5.50 mmol/L (8 g/L) + thr 0.84 mmol/L (1 g/L)。筛选时每组 10 瓶,每瓶 5 个愈伤组织小块。

1.3 培养方式

以固体培养为主。在无菌水中切割材料以防外植体变褐,并在培养基中加入活性炭(5g/L)或柠檬酸(1g/L)。诱导培养时先将外植体进行漂浮培养。继代培养初期进行浅层培养,继而进行固体培养。部分材料采用看护培养。分化培养采用固体培养方式。

1.4 培养条件

诱导培养及胁迫培养: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 黑暗;分化培养时加 2 000 lx 光照 8~10 h/d。

1.5 氨基酸分析

由本所技术室测定,愈伤组织干燥、恒重,莲籽去壳后干燥、恒重,在盐酸中(110°C)水解 22 h 后用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪分析。

2. 结果与分析

2.1 体细胞无性系的建立

幼胚叶及子叶部分对反应敏感,较易形成愈伤组织,其结构较致密,表面粗糙,但并非每个外植体均可以形成愈伤组织,部分外植体虽启动,并不产生愈伤组织,其诱导率约为 50%~70%。实验表明,培养胚叶、子叶的培养基为: MS+ZT 4 mg/L+NAA 2 mg/L+2,4-D 0.5

mg/L。胚轴及幼胚幼叶切口处形成的愈伤组织一般较疏松,其诱导率约为 30%。曾对花药、未授粉子房进行培养,仅花丝部分形成愈伤组织,淡黄色,较疏松。培养后的胚珠膨大,为原来的 3~5 倍,切片显示系珠心组织细胞分裂发育所致,后来死亡。

固体培养对诱导愈伤组织的产生是有效的,但外植体易褐化;液体漂浮培养对诱导愈伤组织效果不理想,但经过漂浮培养的外植体不易褐化,其形成的愈伤组织也比较不易褐化;看护培养在培养初期是有效的,随着愈伤组织的扩大,生长受到抑制。经过较长时间培养的莲愈伤组织对褐化较不敏感,可在 MS+ZT 1 mg/L+NAA 1 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L 的培养基中形成大量的愈伤组织,用于无性变异系的筛选。

愈伤组织在转移到 MS+ZT 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 的培养基上后 1 周,可在愈伤组织上见到突起,渐渐形成芽。待芽长到 2~3 cm 时,转移到 MS+ZT 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L 培养基上培养 1 周左右,可在愈伤组织周围形成根,培养过程中芽伸展,在节的位置产生根。通过移栽,再生植株已经成活。从形成再生植株来看,以子叶愈伤组织较易产生,胚轴、幼胚叶形成的愈伤组织变得疏松时,难以形成再生植株。

2.2 体细胞无性变异系的筛选

愈伤组织转到含 lys+thr 培养基上经 30 d 观察,1 号培养基上的愈伤组织生长良好,无死亡及褐变发生;0 号培养基上的愈伤组织也生长良好,说明低浓度的 lys+thr 对愈伤组织的生长有促进作用。2 号培养基上的愈伤组织生长受到抑制,有褐色及死亡产生。3 号培养基上的愈伤组织明显受到抑制,大多数愈伤组织死亡,另有 5 块褐色愈伤组织长出新的愈伤组织块。4 号及 5 号培养基上的愈伤组织在培养后陆续死亡。产生的抗性愈伤组织扩大培养 30 d 后,一部分已分化成再生植株,另一部分接到 4 号培养基上,结果逐渐死亡。

再生植株在移栽前打开瓶塞 1 周,然后移至灭菌的砂培养基中加 1/3 生根培养基,逐渐移到塘泥中,并在室内培养 1 周,置于室外见自然光。

第二年取再生植株的幼胚再诱导愈伤组织,以原始愈伤组织为对照,检测抗性是否遗传,结果抗性愈伤组织及原始愈伤组织均可以在 0 号培养基上生长,但以原始愈伤组织为好,抗性愈伤组织虽然可以生长但长势不良;而在 3 号培养基上抗性愈伤组织可以生长,原始愈伤组织则不能生长。这一结果说明再生植株所获得的抗性已遗传给子代,以下的氨基酸分析更加证实了这种抗性的遗传。

2.3 愈伤组织细胞内氨基酸成分含量分析

取抗性愈伤组织及原始的杂种愈伤组织进行氨基酸分析,其结果可以直接反映筛选前后同类愈伤组织的变化(表 1)。

从表 1 可见,在 17 种氨基酸中,抗性愈伤组织有 14 种超过原始愈伤组织,1 种持平,2 种不及原始愈伤组织。特别是细胞内与天冬氨酸合成途径有关的氨基酸如赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸等均增加;其他如天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、精氨酸也有不同程度的增加。但脯氨酸及蛋氨酸减少。说明愈伤组织的变异是由赖氨酸加苏氨酸的反馈抑制作用产生的。

2.4 变异体莲籽与亲本莲籽氨基酸含量比较

氨基酸分析表明,莲籽中氨基酸比较齐全,含有 17 种氨基酸,其中 8 种是人体所必需的。

表 2 显示,变异体莲籽的氨基酸总量超过亲本红花建莲 22.4%,超过白心湘莲 37.9%。

在 17 种氨基酸中, 变异体有 12 种超过红花建莲, 15 种超过白心湘莲。其增加的趋势与愈伤组织在胁迫培养前后的变化趋势相似, 即与天冬氨酸途径有关的氨基酸增加。说明通过赖氨酸加苏氨酸的筛选而获得的这种性状可以遗传给后代。由于莲主要依靠无性繁殖进行栽培, 其莲籽氨基酸含量高的性状可以通过这种方式保持下去。

表 1 莲的抗性愈伤组织与原始愈伤组织氨基酸含量(%)
Tab 1 Content of amino acids in resistant callus and in normal callus of *Nelumbo nucifera*

氨基酸种类 Amino acid	原始愈伤组织 Normal callus	抗性愈伤组织 Resistant callus	氨基酸种类 Amino acid	原始愈伤组织 Normal callus	抗性愈伤组织 Resistant callus
天冬氨酸 ASP	2.16	9.78	亮氨酸 LEU	0.60	1.11
苏氨酸 THR	0.63	0.81	酪氨酸 TYR	0.22	0.41
丝氨酸 SER	0.96	0.99	苯丙氨酸 PHE	微	0.33
谷氨酸 GLU	3.35	4.92	赖氨酸 LYS	1.27	1.50
甘氨酸 GLY	0.93	0.99	组氨酸 HIS	0.57	1.15
丙氨酸 ALA	1.13	1.38	精氨酸 ARG	2.08	2.38
半胱氨酸 CYS	0.18	0.18	脯氨酸 PRO	1.08	0.56
缬氨酸 VAL	0.90	0.99	总含量 Total	17.07	28.34
蛋氨酸 MET	0.26	0.19			
异亮氨酸 ILE	0.65	0.67			

表 2 变异体莲籽与亲本莲籽氨基酸含量(%)比较
Tab 2 Comparison of amino acids content between in variant seeds and in its parent seeds of *Nelumbo nucifera*

氨基酸种类 Amino acid	红花建莲 ¹⁾ Honghuajianlian	白心湘莲 ¹⁾ Baixinxianglian	变异体 Variants	氨基酸种类 Amino acid	红花建莲 ¹⁾ Honghuajianlian	白心湘莲 ¹⁾ Baixinxianglian	变异体 Variants
天冬氨酸 ASP	1.90	1.55	2.28	亮氨酸 LEU	1.05	0.97	0.47
苏氨酸 THR	0.51	0.51	0.74	酪氨酸 TYR	0.48	0.41	0.41
丝氨酸 SER	1.04	0.89	1.21	苯丙氨酸 PHE	0.68	0.60	0.60
谷氨酸 GLU	4.58	3.65	4.49	赖氨酸 LYS	0.84	0.78	1.15
甘氨酸 GLY	0.72	0.73	0.97	组氨酸 HIS	0.34	0.32	0.58
丙氨酸 ALA	0.77	0.70	0.91	精氨酸 ARG	0.81	0.88	1.69
半胱氨酸 CYS	微	0.10	0.22	脯氨酸 PRO	0.16	0.21	0.51
缬氨酸 VAL	0.79	0.76	1.00	总含量 Total	15.79	14.01	19.32
蛋氨酸 MET	微	0.15	0.20				
异亮氨酸 ILE	0.64	0.62	0.89				

¹⁾ 引自参考文献[1]。数据系本所技术室在不同时间内测定。

Data from reference [1]. The data were determined by our institute at different time.

3 讨 论

利用氨基酸对愈伤组织进行筛选以获变异体的研究已取得一定进展。本实验以反馈抑制原理为基础, 利用赖氨酸加苏氨酸进行胁迫培养, 使培养物对蛋氨酸或其中间产物感到饥饿, 从而只有变异体才能生存, 这从氨基酸种类的增加趋势可以看出, 与天冬氨酸合成途径有关的氨基酸增加, 相反, 脯氨酸等则减少, 莲籽中氨基酸含量的增加趋势与愈伤组织中氨基酸含量增加趋势相似, 验证了本实验中莲籽氨基酸含量的增加应是利用赖氨酸加苏氨酸胁迫的结果。这一原理在玉米^[3,4]等植物中得到应用, 本研究获得类似结果, 说明这个方法是有效

的。

氨基酸分析结果表明,愈伤组织在赖氨酸加苏氨酸胁迫培养下已发生了变化。在筛选培养基上变异体莲籽愈伤组织可以生长,但原始愈伤组织则不能生长;而在普通培养基上抗性愈伤组织长势不良,原始愈伤组织则生长良好。说明这种抗性,即与天冬氨酸代谢有关的氨基酸含量增加,已遗传给子代。由于莲的繁殖方式主要以营养繁殖为主,筛选出的变异体可以通过无性繁殖保持下去,其高氨基酸的特性也可以通过无性繁殖传给后代,为莲的育种开辟一条新途径。

参 考 文 献

- 1 中国科学院武汉植物研究所 著. 中国莲. 北京:科学出版社,1987.
- 2 何子灿,刘士佳. 莲胚愈伤组织诱导及植株再生的研究. 水生生物学报,1987,11(3):278-280.
- 3 何子灿,刘士佳. 莲离体茎尖的培养. 水生生物学报,1987,11(2):191-192.
- 4 Liu Ta-Chu. Cultivation of excised plumules of *Nelumbo speciosum in vitro*. Bot Bull Acad Sin, 1948, 2: 207-210.
- 5 Bourgin J P. Valine-resistant plants from *in vitro* selected tobacco cells. Mol Gen Genet, 1978, 161: 225-230.
- 6 Hibberd K A, Green C E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistant selected in maize tissue culture. Proc Natl Acad, USA, 1982, 141: 559-563.
- 7 缪树华, Duncan D R, Widholm J M. 抗赖氨酸加苏氨酸玉米突变体的选择. 植物学报,1987,29(6): 565-572.
- 8 Bright S W J, Mifflin B J, Rogness S E. Threonine accumulation in the seeds of a barley mutant with an altered aspartate kinase. Biochem Genet, 1982, 20: 229-243.
- 9 Bryan P A, Cawley R A, Brunner C E *et al*. Isolation and characterization of lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant. Biochem Biophys Res Commun, 1970, 41: 1211-1217.

(责任编辑:许定发)

国际植物园协会亚洲分会第三届学术讨论会在乌鲁木齐召开

国际植物园协会亚洲分会第三届学术研讨会,于1997年8月26日至29日在新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市召开。

会议中心议题是“植物园与可持续发展”。来自全国23个省、市、自治区、香港特区以及日本、印度、斯里兰卡、土耳其、越南、印度尼西亚、美国、澳大利亚等国家180多位代表参加了此次盛会。新疆自治区人大主任及各界领导到会祝贺大会的顺利召开。

这次学术会议内容丰富,气氛热烈,国内外学者围绕植物园在基础研究、生物多样性保护与利用等方面进行了广泛深入的交流。大会报告的论文有:《21世纪北京市植物园科普教育展望》、《发挥植物园综合性的“植物系统工程”科学研究与实验基地的

作用,为社会服务》、《龙岗植物园的建设与开发》、《杭州植物园植物多样性保护和利用》、《中国西北干旱地区植物园的重要意义》、《植物园与生物多样性保护》、《银杏精子的发现与东京大学植物园用于科研的其它植物》、《大阪大学植物园展示的11种日本森林类型》、《土耳其庭院文化和Anatolia植物园》、《菲律宾La Union植物园建设经验》、《以色列乡土及引进的芝麻菜生物多样性》、《澳大利亚植物园介绍》等。

会议期间,还以板报形式展示各植物园近年来在科研和开发中取得的成果和新进展。代表们还考察了沙漠干旱地区的植物。会议取得圆满成功。

(曾虹)