

金花茶胚状体中游离氨基酸的含量 及花氨酸、丝氨酸对胚状体发育的影响

彭艳华

庄承纪 段金玉

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074) (中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 本文报道金花茶 *Camellia chrysantha* (HU) Tuyama 胚状体培养中, 具有正常产生次级胚能力的材料(第一类)和产生次级胚能力差的材料(第二类)的游离氨基酸测定结果, 以及脯氨酸、丝氨酸对胚状体发生的培养结果。所检出的氨基酸含量, 第一类材料为第二类材料的1—5倍; 且第二类材料中未能检出脯氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。在此基础上培养发现: 脯氨酸和低浓度(50mmol、100mmol)的丝氨酸促进胚状体发生与鲜重增加, 脯氨酸、丝氨酸和苯丙氨酸以50mmol混合使用效果最好, 而且除色氨酸外, 这些外加氨基酸对胚体形成频率、数目和鲜重的影响之间都有平行关系。

关键词 游离氨基酸; 脯氨酸; 丝氨酸; 金花茶; 胚状体发生

据报道, 几种外源氨基酸可以不同程度地调节胚状体发生^[3,4,8,10,12,14,16]。Kamada和Harada^[8]测定过胡萝卜胚状体发育不同阶段的氨基酸含量, 徐竹筠^[4]也进行了不同类型的胡萝卜愈伤组织的氨基酸水平比较。我们检测了金花茶体细胞胚状体发育过程中, 产生胚状体能力不同的材料的游离氨基酸水平, 而后选择外源氨基酸进行胚状体发生培养, 试图从内源和外源两方面, 探讨氨基酸对胚状体发生的调节作用。

材料与 方法

1. 游离氨基酸的测定

供试材料金花茶的体细胞胚状体发生培养按庄承纪的方法^[1]。该材料继代培养数代后, 分为两类: 第一类材料呈乳黄或淡绿色, 光泽度较好, 具有正常产生次级胚的能力, 从发育时期看, 是一混合材料。第二类呈浅灰或深绿色, 光泽度差, 在解剖镜下其组织疏松或较老化, 产生次级胚能力弱。两类材料各取样10克。样品处理(游离氨基酸提取与初纯化)按吴显荣^[2]的程序完成。用LKB4400型氨基酸自动分析仪测定。

2. 外源氨基酸进行胚状体发生培养

在测定的基础上选取外源DL-脯氨酸(50mmol、100mmol、200mmol、500mmol、1000mmol), L-丝氨酸, L-苯丙氨酸, L-色氨酸(各为250mmol、50mmol、100mmol、300mmol、600mmol)及其混合氨基酸(各为25mmol、50mmol、100mmol、300mmol、600mmol)进行胚状体发生培养。每组处理接种5瓶, 每瓶接5块, 每块2—3mm见方。5周后统计胚状体形成频

本文于1988年11月25日收到。

率、数目和鲜重。培养实验重复3次。

结果与讨论

1. 氨基酸分析结果

金花茶体细胞胚状体发生培养中,两类材料的游离氨基酸分析得出,产生胚状体能力正常者,氨基酸含量均比胚状体产生能力弱者高。归纳起来有如下特点:①胚状体产生能力正常者检出了脯氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸,而胚状体产生能力弱者未能检出;②丝氨酸、色氨酸、甘氨酸及天门冬氨酸,在两类材料中含量相差4倍以上;③其它氨基酸和 NH_3 的水平也相差1—3倍;④精氨酸在两类材料中均是含量最高的氨基酸。详细情况见表1所示。

表1 金花茶胚状体培养材料的游离氨基酸分析结果
Table 1 The analysis result of free amino acids of samtic embroied culture materials in *Camellia chrysantha* (HU) Tuyama

氨基酸 AA	氨基酸含量(毫克/克·鲜重材料) AA content(mg/g.fwt)		含量之比(第一类/第二类)
	第一类材料 First mat.	第二类材料 Second mat.	Ratio of content (Fir./Sec.)
	天门冬氨酸 ASP	14.880	3.285
苏氨酸 THR	0.321	0.311	1.0
丝氨酸 SER	23.608	4.640	5.0
谷氨酸 GLU	20.570	6.710	3.0
脯氨酸 PRO	3.702	0.000	∞
甘氨酸 GLY	0.570	0.111	5.1
丙氨酸 ALA	9.555	5.870	1.9
缬氨酸 VAL	0.750	0.327	2.3
蛋氨酸 MET	2.796	2.389	1.2
异亮氨酸 ILE	0.524	0.314	1.7
亮氨酸 LEU	1.937	1.115	1.7
酪氨酸 TYR	2.010	0.000	∞
苯丙氨酸 PHE	1.533	0.000	∞
组氨酸 HIS	2.810	1.520	1.8
赖氨酸 LYS	1.570	1.184	1.3
精氨酸 ARG	46.115	36.590	1.2
色氨酸 TRP	4.912	1.102	4.4
氨 NH_3	0.423	0.255	1.9

2. 外源氨基酸进行胚状体发生培养结果

外源氨基酸进行胚状体发生培养发现,适当浓度的脯氨酸、丝氨酸及混合氨基酸可以促进胚状体发生,效果最好的是混合氨基酸,其次是脯氨酸。苯丙氨酸和色氨酸则表现抑制作用。详情如表2所示。图1和图2直观告诉我们:①脯氨酸(DL型)促进金花茶胚状体产生的最适浓度为100mmol;②丝氨酸(L型)的最适浓度为50mmol;混③合氨基酸(DL型脯氨酸、L型丝氨酸、L型苯丙氨酸和L型色氨酸)的最佳浓度为50mmol,从图1、2和3可以看到,④脯氨酸、丝氨酸和混合氨基酸及苯丙氨酸对胚状体发生的影响,与它们对其鲜重增加的影响之间具有平行关系;⑤色氨酸对胚状体发生的影响,与对鲜重的影响之间有反相关系,即色氨酸能抑制胚状体发生而增加鲜重。

表2 外源氨基酸对胚状体发生的培养结果

Table 2 Results of amino acids as additive on embryogenesis culture

氨基酸 AA	浓度 (毫摩尔) Con. (mmol)	胚状体形成频率 Frequency of embryogenesis		胚状体数目 Embryoid amount		鲜重(克) Fresh weight(g)	
		产生胚状体的块 数/接种块数 No. of emb. / No. of inocu.	与对照的 百分比率 % of control	胚状体个数 No. of embryoid	为对照的百分比率 % of control	鲜重(克) F.W.(g)	为对照的 百分比率 % of control
对照 Control	0	20/25	100	28	100.0	1.45	100.0
DL-脯氨酸	50	25/25	105	41	167.8	2.20	151.7
	100	25/25	125	56	200.0	2.91	200.9
	200	23/25	115	44	157.1	2.72	187.6
DL-Pro	500	22/25	110	32	114.3	2.1	144.8
	1000	22/25	110	30	107.3	1.75	120.7
L-丝氨酸	25	22/25	110	32	114.3	1.90	131.0
	50	24/25	120	46	164.3	2.66	183.4
	100	23/25	115	37	132.1	2.40	165.5
L-Ser	300	22/25	110	32	114.3	1.90	131.0
	600	17/25	85	26	92.9	1.39	95.9
L-苯丙氨酸	25	20/25	100	27	96.4	1.39	95.9
	50	18/25	90	26	92.9	1.43	98.6
	100	16/25	80	21	75	1.17	80.7
L-Phe	300	16/25	80	19	69.8	1.15	79.3
	600	14/25	70	11	39.3	1.01	69.7
L-色氨酸	25	20/25	100	26	92.9	1.43	98.6
	50	17/25	85	24	85.7	1.45	100.0
	100	15/25	75	20	71.4	1.75	120.7
L-Trp	300	15/25	75	18	64.3	2.20	151.7
	600	14/25	70	17	60.6	2.40	165.5
混合氨基酸 Mix AA	25	25/25	125	71	253.6	3.08	212.4
	50	25/25	125	74	264.3	3.21	221.4
	100	25/25	125	70	250.0	2.90	200.0
	300	25/25	125	70	250.0	2.80	193.1
	600	20/25	100	56	200.0	2.52	173.7

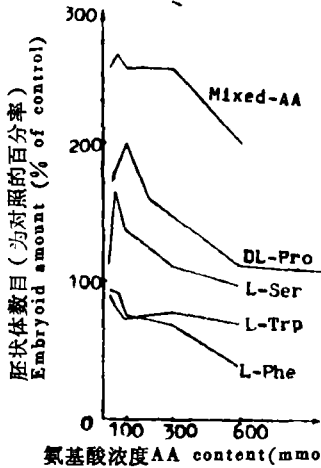


图1 外源氨基酸对胚状体数目的影响
Fig. 1 Effect of extraneous amino acids on embryoids amount

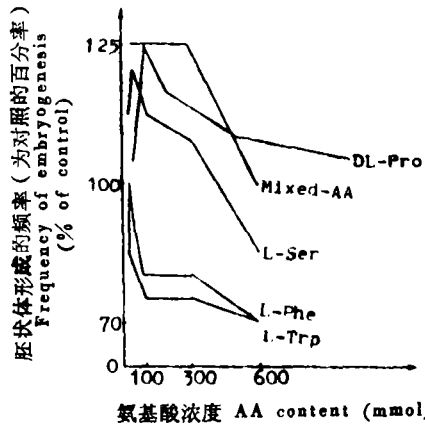


图2 外源氨基酸对胚状体发生频率的影响
Fig. 2 Effect of extraneous amino acids on frequency of embryogenesis

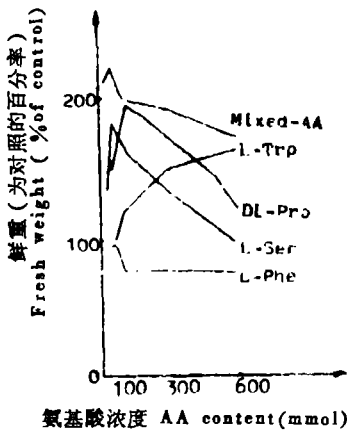


图3 外源氨基酸对鲜重的影响
Fig. 3 Effect of extraneous amino acids on fresh weight

氨基酸分析表明, 氨及氨基酸的水平在胚状体产生能力强的材料中, 均比胚状体产生能力弱的材料高。外源氨基酸进行胚状体发生培养时, 适当浓度的脯氨酸、丝氨酸及混合氨基酸, 均可促进胚状体发生。前人^[8,13,17]在胡萝卜的体细胞胚形成研究中发现, 胚形成要求氨具有一定水平, 外加氨基酸可以调节硝态氮还原原活动, 或修饰硝态氮的代谢; 而且加脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺等氨基酸, 能参与或有利蛋白质的合成^[18]。

外源脯氨酸和丝氨酸对胚状体发生有明显促进作用, 与脯氨酸、丝氨酸在两类材料中的水平具有一致性。我们知道, 脯氨酸和丝氨酸是细胞壁糖蛋白的两个主要组成, 已有人^[9]研究指出, 这些糖蛋白对形态建成有重要作用,

某些遗传或环境因子调节它们的合成, 从而影响形态发生。我们推测, 脯氨酸和丝氨酸的加入, 就引入了与形态建成相关的蛋白质合成前体物质。

脯氨酸对胚状体发生和发育具有明显的促进和改善作用, 也可能是脯氨酸诱导细胞壁物质组成改变和(或)细胞膜性能改变, 以致细胞间 pH 值和植物激素发生变化^[9,11]。

胡萝卜芽形成过程中, 渗透作用的维持极为重要, 而脯氨酸和丝氨酸在代谢中可以维持渗透能力^[10]。实验看到, 高浓度的单一氨基酸都不利金花茶胚状体发生, 这可能是由于高渗透压的不适及造成象单盐毒害类似的效果^[11]。金花茶胚状体培养中, 脯氨酸和丝氨酸的忍耐浓度较高, 这也间接告诉我们, 这两种氨基酸在渗透作用的维持方面起一定作用。

实验还能看到, 除色氨酸外, 其它外源氨基酸的添加对胚状体发生和鲜重的影响之间具有平行性。该作用特点与激素的作用不同。很可能是由于氨基酸对胚状体发生作用的多

向性与时差性决定^[7]。色氨酸是吲哚乙酸的前体物质,而外源吲哚乙酸对金花茶胚状体发生并无正效应^[1]。我们认为色氨酸的加入导致吲哚乙酸浓度升高,破坏了原有激素的平衡,因而不利于胚状体发生。外源色氨酸能加大鲜重,则可理解为一般生长素类物促进细胞分裂所致。

参 考 文 献

- 1 庄承纪. 实验生物学报, 1985; 18: 275—283
- 2 吴显荣. 氨基酸杂志, 1984; 2: 1
- 3 周俊彦. 植物生理学报, 1982; 1: 91—99
- 4 徐竹筠. 植物生理学通讯, 1989; 1: 30—32
- 5 Basile and Basile. *Science*, 1983; 220: 1051—1052
- 6 Beandoin L, Thorp T A. *Plant Physiol*, 1981, 67: 154
- 7 David A Stuart. *Plant Science Letter*, 1984; 34: 164—174
- 8 Dougall D K et al. *In Vitro*, 1978; 44: 180—182
- 9 Guern and Legung. *Plant Physiol*, 1977; 60: 256—270
- 10 Hardy F L, Thorp T A. *Plant Physiol Suppl*, 1981; 67: 7
- 11 Johnson A D, Epeld, Paul M. *Nature*, 1976; 262: 611—614
- 12 Kamada and Harada. *Z Pflanzenphysiol*, 1979; 91: 453—467
- 13 Komaninc A. *Z Pflanzenphysiol*, 1976b; 95: 13—20
- 14 Narayanaswamy. *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Springer-verlay, 1977; 179—248
- 15 Tazana and Reinert. *Acta Bot Croat*, 1986; 45: 71—75
- 16 Thorp T A, Laishley E J. *J Exp Bot*, 1973; 24: 1082—1089
- 17 Vittoria Nuti Ronchi et al. *Plant Cell Reports*, 1984; 3: 210—214

THE CONTENT OF FREE AMINO ACIDS IN SOMATIC EMBRYOIDS OF COMELLIA CHRYSANTHA (HU) TUYAMA AND EFFECTS OF PRO, SER ON SOMATIC EMBRYOGENESIS

Peng Yanhua

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)

Zhuang Chengji, Duan Jinyu

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract This paper reports the free amino acids content of two culture materials in somatic embryogenesis of *Comellia chrysantha* (HU) Tuyama, one of which has the normal ability of producing secondary embryo (The first), and the other has the poorer ability (The second). Amino acids in the first material is one to five-fold that of in the second, and no Phe, Pro and Tyr were detected in the second material.

Based on-mationed results, we utilized Pro, Ser, Phe, Trp and mixed AA to s matic embryogenesis culture. The experiment shows that Pro and low concentration (50mM, 100mM) Ser promote the somatic embryogenesis and fresh weight increase, mixed 50mM Pro, Ser and Phe have the best effect, all of these additional AA except Tyr has a parallel relationship among frequence of embryogenesis, amounts and fresh weight.

Key words Free amino acids; Pro; Ser; *Comellia chrysantha* (HU) Tuyama; Embryogenesis