

# 菜心耐羟脯氨酸初选系的耐热性

廖飞雄<sup>1</sup> 潘瑞炽<sup>2</sup>

(1. 广东省农业科学院花卉研究所, 广东广州 510640; 2. 华南师范大学生命科学院, 广东广州 510631)

**摘要:** 分析了离体筛选出的一个菜心耐羟脯氨酸选择系的脯氨酸含量和耐热性。Hypr01 比原品种六十天特青有较高的游离脯氨酸含量; 35℃热胁迫下 Hypr01 中有显著的游离脯氨酸含量增加, 为六十天特青的 4 倍和耐热品种四九菜心的近 2 倍。与对照相比, 在 35℃下连续培养的 Hypr01 愈伤组织表现出更强的活力和根的分化能力, 鲜重增量明显加大; 相对电解质渗出率、愈伤组织褐变程度和 MDA 含量低; SOD、CAT 活性较高。在人工气候箱模拟栽培高温逆境下, Hypr01 再生苗生长优于未经选择的六十天特青, 并具较低的电解质渗出率和较高的鲜重增长, 说明有较强的耐热性。

**关键词:** 菜心; 耐热性; 羟脯氨酸; 离体筛选; 脯氨酸

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2004) 04-0359-04

## Heat tolerance Characteristics of a Hydroxyproline-resistant Line of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee

LIAO Fei-xiong<sup>1</sup> PAN Rui-chi<sup>2</sup>

(1. Floricultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China;

2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** Proline (Pro) content and heat tolerance were determined in a hydroxyproline-resistant line Hypr01 selected *in vitro* from seedlings of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee. Hypr01 had higher content of free Pro than the original cultivar Liushitianteqing. A greater increase of free Pro content could be found in Hypr01 under heat stress at 35℃, which was 4 times as much as that in Liushitianteqing and nearly 2 times in heat tolerant cultivar Sijiu. Compared to the control, the callus induced from Hypr01 shoots showed vigorous, root differentiation ability and high fresh weight increment when cultured under successive stress at 35℃. Under such condition, the relative electrolyte leakage, callus browning rate and the content of MDA in Hypr01 were significant lower, but the activities of SOD and CAT in Hypr01 was higher. The plantlets regenerated from Hypr01 grew better than those from Liushitianteqing under a heat stress condition (35℃ by day and 25℃ by night both for 12 h) in phytotron, and had lower electrolyte leakage and higher fresh weight increment, which indicated a greater heat tolerance.

**Key words:** *Brassica campestris*; Heat tolerance; Hydroxyproline; *In vitro* selection; Proline

通过筛选植物抗羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 变异来获得高抗逆性植物新品种, 在小麦、马

铃薯等多种作物上已有研究, 对筛选出的变异进行抗性和生化指标的分析鉴定表明, 这些抗 Hyp 的变

收稿日期: 2003-07-03 接受日期: 2003-10-20

基金项目: 广东省“九五”重点科技攻关项目 (970308) 资助

**缩略词 Abbreviation:** Hyp: 羟脯氨酸 Hydroxyproline; Pro: 脯氨酸 Proline; POD: 过氧化物酶同工酶 Peroxidase; SOD: 超氧化物歧化酶同工酶 Superoxide dismutase; CAT: 过氧化氢酶同工酶 Catalase; MDA: 丙二醛 Malondialdehyde; PBS: 磷酸盐缓冲液 Phosphate buffered saline; NBT: 氮蓝四唑 P-Nitro blue tetrazolium chloride; TCA: 三氯乙酸 Trichloroacetic acid; TBA: 2-硫代巴比妥酸 2-Thiobarbituric acid; 6-BA: 6-苄氨基嘌呤 6-Benzylaminopurine; NAA: 萘乙酸 Naphthalene acetic acid

异有较高的 Pro 含量,对 NaCl、水分胁迫或冷害逆境有较强的抗性<sup>[1-3]</sup>。芸苔属蔬菜中甘蓝也见有抗 Hyp 变异筛选的报道<sup>[4]</sup>。菜心,又名菜薹(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee)是华南地区重要的绿叶蔬菜,改进其耐热性,对实现周年供应优质产品有重要意义。我们已探明在菜心中脯氨酸的积累和外源脯氨酸对其耐热性的作用<sup>[5]</sup>,并建立了离体筛选耐 Hyp 变异的方法,初选出了一些耐 Hyp 的材料<sup>[6,7]</sup>。Hyp 抗性系对高温胁迫是否也具有较强的抗性,能否通过选择 Hyp 耐性系来培养耐热新品种,目前很少研究。本文通过对一个菜心耐 Hyp 变异的耐热性进行分析研究,以探明耐 Hyp 系的对高温胁迫的响应和 Pro 在抗热中可能的生理作用,并为建立耐热新品种筛选新途径提供依据。

## 1 材料和方法

**菜心耐 Hyp 和离体培养系的建立** 菜心品种‘六十天特青’一个耐 Hyp 幼苗选择系,代号 Hypr01。由无菌种子于含 5 mg ml<sup>-1</sup> Hyp 的 1/2MS 培养基上萌发和培养,选择存活株于不含 Hyp 的培养基上恢复生长,经连续三个培养周期淘汰,选择生长正常植株作为选择系。选择系于分化培养基上增殖芽苗和诱导愈伤组织供鉴定分析实验。以平行培养的‘六十天特青’(以下简称‘六十天’)和耐热品种‘四九’菜心作对照。愈伤组织的继代培养基为 MS+2 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA+ 0.2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 7 g L<sup>-1</sup> 琼脂 +30 g L<sup>-1</sup> 蔗糖, 无菌苗生长培养基为 1/2MS+7 g L<sup>-1</sup> 琼脂 +30 g L<sup>-1</sup> 蔗糖。

**温度逆境处理** 高温胁迫温度 35℃,去胁迫后培养和对照温度 25℃,于 LHR-250-H 恒温光照培养箱中进行,光照强度 10–14 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,光照 12 h d<sup>-1</sup>。

**游离脯氨酸含量测定** 参照张殿忠<sup>[8]</sup>方法。称取鲜重约 0.1 g 的样品,用 5 ml 3% (w/w) 磺基水杨酸煮沸提取 60 min,酸性茚三酮染色。

**电导率测定** 取组织培养茎尖苗或愈伤组织,用重蒸水漂洗三次,于装有 10 ml 重蒸水的试管中,摇动 2 h 后用 DDS-11A 电导仪测定电导值,然后煮沸 30 min 冷却至 25℃测定总电导值,重复 3 次。按下式计算:相对电解质渗出率(%)= 处理电导值 / 总电导值 × 100%

**愈伤组织热胁迫下鲜重相对增量测定** 称取鲜活愈伤组织(FW<sub>0</sub>)约 180–240 mg 分成 6–8 小块接种于三角瓶,35℃下连续培养,第 21 天称取鲜重(FW<sub>t</sub>),统计褐变块数和生根数,重复 4 次,鲜重相

对增量(FW<sub>Δ</sub>)=(FW<sub>t</sub>-FW<sub>0</sub>)/FW<sub>0</sub>。

**POD、CAT 和 SOD 活性测定** 样品用 pH7.8 PBS 冰浴研磨提取,于 BECKMAN 高速离心机上 15 000 × g, -4℃ 离心 20 min,上清液用于测定酶活性和其它指标。POD 活性用愈创木酚显色法;SOD 活性用 NBT 还原法;CAT 活性参照 Beens 和 Sizer 的方法;可溶性蛋白质含量用考马斯亮兰法,具体测定同前文<sup>[5]</sup>。

**MDA 含量测定** 用 10%TCA(含 0.5%TBA)煮沸 30 min 后快速冷却,4 000×g 离心 15 min,取上清液于 532 nm 和 600 nm 处测定 OD 值,含量按 OD<sub>532</sub>-OD<sub>600</sub>=155×10<sup>3</sup> 换算。

**高温对生长的影响** 模拟大田高温生长条件于 Heraeus2000(Germany)人工气候箱中进行。将无菌苗每瓶 5 株称重,接种于 1/2 MS 培养基上,置于人工气候箱中处理,白天 35℃,夜晚为 25℃,交替周期 12 h,光照强度 600–800 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,空气湿度 80%,30 d 后称取鲜重。取叶片测定电导值,重复 3 次,计算同前。

试验按随机区组设计,结果显著性检验用 SSR 法或 LSR 法。

## 2 结果

### 2.1 游离 Pro 含量及热胁迫下 Pro 的积累

游离 Pro 含量分析结果表明,选择系 Hypr01 愈伤组织有较高的 Pro 含量(表 1),是未经选择的对照品种‘六十天’含量的 3 倍多。在 35℃下热胁迫培养 24 h 后,Hypr01 愈伤组织游离 Pro 含量明显增高,而‘六十天’则增量很少,两者此时含量相差 4 倍多,比耐热的‘四九’品种还高。去热胁迫 48 h 后 Hypr01 的 Pro 含量明显下降,甚至低于对照温度 25℃时的含量;‘四九’品种是菜心中较耐高温的品种,在热胁迫下出现 Pro 积累和去胁迫后大幅度下降,Hypr01 的 Pro 变化趋势与之相同。

### 2.2 热胁迫下愈伤组织的分化和褐变

高温胁迫下,愈伤组织的表现反映出选择系在组织和细胞水平上的耐热性。从图 1 中可以看出在 35℃下持续热胁迫 15 d 后,Hypr01 愈伤组织具有显著强的生存和生长活力,形成了较多鲜活愈伤组织,并分化出了根系,表现出了良好的耐热性。热胁迫下培养 21 d 后,‘六十天’愈伤组织的鲜重相对增长量很小,仅为 1.27,明显受高温抑制,而 Hypr01 的相对增量高达 3.46,两者差异极显著;但 Hypr01 与耐热的‘四九’菜心的增量(3.77)无显著差异,可

表1 35℃ 24 h 热胁迫下 Hypr01 愈伤组织游离脯氨酸含量( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW)

Table 1 The contents of free proline in Hypr01 calli under heat stress at 35℃ for 24 h

愈伤组织 Calli	25℃对照 Control	35℃处理 Treatment	去胁迫 48 h 48 h after heat stress-free
Hypr01	49.37±1.68	66.45±6.45	46.54±2.70
‘六十天’ ‘Liushitian’	14.58±0.27	15.72±0.75	13.74±1.96
‘四九’ ‘Sijiu’	17.81±2.53	34.24±3.26	8.43±0.68

见 Hypr01 在高温条件下能有较好的细胞分裂和生长能力。耐热性还表现在愈伤组织褐变程度和分化能力上(图 2),选择系表现出了更强的耐高温能力,在高温胁迫下褐变率低,程度轻,并保持较强的分化的能力,有 23.81%的愈伤组织块分化产生了根。选择系和‘四九’菜心完全褐变的愈伤组织所占比率均低于‘六十天’。

### 2.3 热胁迫下 Hypr01 愈伤组织细胞膜稳定性和膜保护酶活性

相对电解质渗出率和丙二醛含量反映出逆境下细胞膜的稳定性。从表 2 可见热胁迫 21 d 后,Hypr01 愈伤组织相对电解质渗出率显著低于‘六十天’,也比‘四九’菜心略低,说明选择系在长期热胁迫后,能使细胞膜保持较好的稳定性,防止电解质的渗漏。细胞丙二醛(MDA)含量同样比‘六十天’低,差异极显著,与‘四九’菜心的差异不显著,说明受胁迫后 Hypr01 的细胞膜过氧化程度远低于‘六十天’,也在一定程度上低于耐热品种‘四九’菜心,结果与相对电解质渗出率一致。细胞保护酶活性在一定程度上也反映出选择系抗性的增强,Hypr01 的 SOD 活性( $68.95 \text{ U mg}^{-1} \text{ Protein min}^{-1}$ )和 CAT 活性( $1.32 \Delta\text{OD mg}^{-1} \text{ Protein min}^{-1}$ )高于‘六十天’的活性(64.78 和 1.28),但均略比‘四九’

菜心(71.06 和 1.42)低。而 Hypr01 的 POD 活性( $45.07 \Delta\text{OD mg}^{-1} \text{ Protein min}^{-1}$ )高于‘四九’菜心(36.98),但与‘六十天’(45.89)没有差异。

表 2 热胁迫下 Hypr01 细胞膜透性和 MDA 含量

Table 2 Cell membrane permeability and MDA content in Hypr01 calli under heat stress at 35℃ for 21d

	相对电解质渗出率 Relative electrolyte leakage (%)	MDA ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)
Hypr01	57.60±2.09 A	1.91±0.12 A
‘六十天’ ‘Liushitian’	72.04±4.70 B	3.22±0.14 B
‘四九’ ‘Sijiu’	59.97±2.01 A	2.08±0.23 A

不同字母示极显著差异 Different letters within a column indicate significant difference at  $p < 0.01$

### 2.4 模拟胁迫下 Hypr01 再生苗的耐热性

在人工气候箱中模拟接近实际栽培中的高温胁迫条件,对选择系再生瓶苗进行培养。表 3 结果表明 Hypr01 在 35℃/25℃交替下生长良好,能发根,形成完整植株和正常生长;叶色深绿,无伤害症状出现。其植株鲜重相对增量高于‘六十天’,差异显著;相对电解质渗出率也极显著低于‘六十天’,说明与原品种相比,Hypr01 较能适应高温的生长条件。

## 3 讨论

小麦<sup>[1,2]</sup>、马铃薯<sup>[3]</sup>和柑桔<sup>[4]</sup>等抗 Hyp 选择系有较强的低温抗性,但对高温抗性研究较少。存活率、生长量和膜透性等是植物耐热性鉴定和生理研究中的最基本的指标<sup>[10,11]</sup>,从这几个指标来看,菜心抗 Hyp 选择系 Hypr01 热胁迫下有较大的鲜重增量、低的相对电解质渗出率和较高的抗褐变力;在模拟高温逆境下培养的再生苗也表现出了较好的耐高温特性,可见 Hypr01 显示出了较强的耐热性。SOD 和 CAT 等保

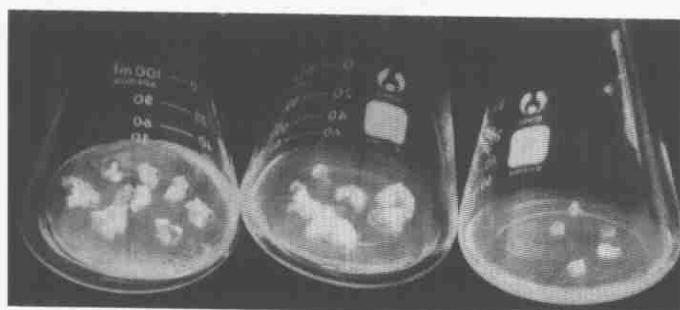


图 1 35℃热胁迫 15 d 后,Hypr01 愈伤组织(中)具较强增殖和分化能力 对照为‘四九’菜心(左),‘六十天’(右)

Fig.1 The calli of Hypr01 (middle) under heat stress at 35℃ for 15 days, showing the well differentiated calli. Shijiu cultivar (left) and Liushitian cultivar (right) for control.

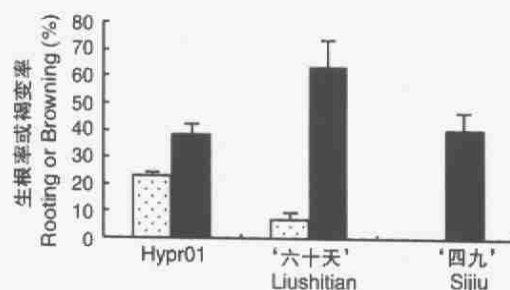


图 2 35℃高温胁迫下愈伤组织生根率(□)和褐变率(■) Fig.2 Rooting (□) and browning (■) of Hypr01 calli cultured at 35℃

表 3 35°C/25°C 培养下 Hypr01 再生苗的耐热性表现

Table 3 Heat tolerance of Hypr01 plantlets cultured at 35°C/25°C (day/night) in phytotron\*

	相对电解质渗出率 Relative electrolyte leakage (%)	鲜重相对增量 Fresh weight relative increment
Hypr01	18.42±0.82 A	11.53±0.65 a
‘六十天’ ‘Liushitian’	26.26±2.74 B	8.57±0.38 b

\* 35°C/25°C = day/night temperature for 12h/12h. 不同大写和小写字母分别表示极显著和显著差异 Different capital letters and small letters within a column indicate significant difference at  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively.

护酶活性一定程度上的提高,也反映出其有较高的耐热性。一些从培养细胞水平上筛选出的细胞突变,再生植株后并非都能表达,常出现抗性消失的情况<sup>[12,13]</sup>。耐 Hyp 选择系 Hypr01 是一个在整体水平上筛选出来的株系,在细胞水平上是否具有抗性呢?本研究用再生苗诱导出的愈伤组织进行耐热性分析,结果表明愈伤组织表现出较强的耐热性,从而在组织和细胞水平上证实了选择系耐热性的提高和变异的可能。

抗 Hyp 变异对盐胁迫、低温等逆境的抗性提高,认为与 Pro 含量明显增高后,细胞渗透势下降,渗透调节能力加强有关<sup>[1-3]</sup>;短时间热激后,番茄培养细胞和幼苗内<sup>[14]</sup>,高温逆境下甘蓝<sup>[4]</sup>和菜心<sup>[5]</sup>中都出现 Pro 的明显积累,表明 Pro 含量的提高是对高温逆境的响应。菜心中耐热品种‘四九’中 Pro 含量和热胁迫下的积累都高于不耐热的‘六十天’,本研究中抗 Hyp 选择系 Pro 含量显著高于原品种和‘四九’菜心品种,而且细胞膜的稳定性提高,说明其耐热性的提高与 Pro 含量提高有关;但更可能与 Pro 合成与代谢的活跃有关<sup>[5]</sup>,与‘四九’菜心一样,选择系在热胁迫下和去胁迫后愈伤组织细胞中 Pro 含量增加及去胁迫后显著下降,也表现出大幅度的变化。但甘蓝茎尖抗 Hyp 选择系却没有发现高 Pro 含量与耐热性提高有关<sup>[4]</sup>,可能与所用的耐热性指标有关。

Hypr01 移栽后生长良好,具浓绿的叶和苍色,能正常开花结实,为一有潜力的种质。因此,可以看出,通过用 Pro 类似物 Hyp 作选择压力,从生理生化机理上着手进行耐热性变异的筛选是可能的,而且离体培养易操作和控制,有利于体细胞变异的纯合,是有潜力的抗逆种质筛选途径。

#### 参考文献

[1] Tantau H, Dorffling K. *In vitro* selection of hydroxyproline-resistant cell lines of wheat (*Triticum aestivum*): accumulation of

proline, decrease in osmotic potential, and increase in frost tolerance [J]. *Physiol Plant*, 1991, 82:243-248.

- [2] Dorffling K, Dorffling H, Lesselich G. *In vitro*-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance [J]. *J Plant Physiol*, 1993, 142:222-225.
- [3] van Swaaij A C, Jacobsen E, Kiel J A K W, et al. Selection, characterization and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: I. Tolerance to NaCl and freezing stress [J]. *Physiol Plant*, 1986, 68:359-366.
- [4] Cao B H (曹必好), Lei J J (雷建军). *In vitro* selection of resistant variant of cabbage and its characteristics [J]. *Acta Agri Boreali-Sin* (华北农学报), 2001, 16(2):62-66. (in Chinese)
- [5] Liao F X (廖飞雄), Pan R C (潘瑞炽). Accumulation of proline under heat-stress and its function on heat-tolerance in *Brassica campestris* L. ssp. *chinesis* var. *utilis* Tsen et Lee [J]. *J South China Norm Univ* (华南师范大学学报), 2001, (2):45-49. (in Chinese)
- [6] Liao F X (廖飞雄), Pan R C (潘瑞炽). Physiological effects of hydroxyproline on seedlings, shoots and callus of *Brassica campestris* L. ssp. *chinesis* var. *utilis* Tsen et Lee [J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), 2004, 40(1):56. (in Chinese)
- [7] Liao F X (廖飞雄), Pan R C (潘瑞炽). Screening *in vitro* of hydroxyproline-resistant lines of *Brassica campestris* L. ssp. *chinesis* var. *utilis* Tsen et Lee [J]. *Acta Agri Univ Jiangxi* (江西农业大学学报), 2003, 25(6):875-878. (in Chinese)
- [8] Zhang D Z (张殿忠), Wang P H (汪沛洪), Zhao H X (赵会贤). Determination of the content of free proline in wheat leaves [J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), 1990, (4):62-65. (in Chinese)
- [9] Lin D B (林定波), Yan Q S (颜秋生), Shen D X (沈德绪). A study on selection of hydroxyproline-resistant somaclonal cell line from *Citrus* and evaluation of its cold tolerance [J]. *J Zhejiang Agri Univ* (浙江农业大学学报), 1999, 25(1):94-98. (in Chinese)
- [10] Behl R K, Heise K P, Moawad A M. High temperature-tolerance in relation to change in lipids in mutant wheat [J]. *Tropenlanlwin*, 1996, 97(2):131-135.
- [11] Shanahan J F, Edward I B, Quick J S, et al. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat [J]. *Crop Sci*, 1990, 30:247-251.
- [12] Zhou R R (周荣仁), Yang X R (杨燮荣), Ji Y M (季玉鸣), et al. Salinity adaptation of tobacco salt-tolerant callus variant [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1993, 19(2):188-194. (in Chinese)
- [13] Xu Y (许耀). Selection characterization and application of cell mutants resistant to amino acid and amino acid analogues in higher plants [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1988, 5(4):193-198. (in Chinese)
- [14] De B, Bhattacharjee S, Mukherjee A K. Short term heat shock and cold shock induced proline accumulation in relation to calcium involvement in *Lycopersicon esculentum* (Mill) cultured cells and seedling [J]. *Indian J Plant Physiol*, 1996, 1(1): 32-35.