

不同光质对喜树愈伤组织形成及分化潜质影响

陈 博, 陈哲皓, 王利琳, 胡江琴

(杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036)

摘 要:以喜树无菌苗的茎、叶为外植体,研究了蓝、白、红 3 种光质下,MS、1/2MS、SH、WPM 4 种培养基对喜树愈伤组织形成及分化潜质影响。结果表明:蓝光下 SH+1.0 mg/L NAA+0.075 mg/L TDZ 培养基上愈伤组织诱导效果最好;愈伤组织继代后在蓝光下第 7 天时,SOD 酶活最高,POD 酶活最低,含水量最低,分化的潜力最大。

关键词:光质;愈伤组织;分化潜力;喜树

中图分类号:S 792.119 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)17-0112-04

喜树(*Camptotheca acuminata* Decaisne)为山茱萸目(Cornales)珙桐科(Nyssaceae)喜树属落叶乔木。喜树多用于家具制造、包装材料、坑木、纸浆和燃材;近年研究发现,喜树次生代谢物喜树碱(CPT)和 10-羟基喜树碱(HCPT)具备抗肿瘤的活性,其主要来源为喜树的树皮和种子^[1]。喜树属木本植物,目前野生喜树的资源有限,且数量正在快速的减少,因而对喜树快繁、组织培养和再生体系的探索一直是近年来领域内的研究热点。木本植物生长发育条件、器官部位等与草本植物相比有较大差异,同时细胞的正常分裂受到较高含量的酚类物质阻碍^[2],因此木本植物再生体系的建立相对困难,与草本植物相比相关文献报道也少很多。目前已有文献报道了喜树组织培养和植株再生的初步探索,2004 年陈颖等^[3]和吕立堂等^[4]分别用带芽的喜树茎段和幼苗的茎尖为外植体,初步建立喜树无性微繁再生体系;2005 年郭勇^[5]在 MS 培养基上由茎段诱导出不定芽;2006 年 Wang 等^[6]通过叶子和茎段快繁成功但是总体效率不高。但是目前尚未见到喜树愈伤组织诱导和在此基础上分化成苗的系统性报道。

在植物的组织培养过程中,光照是十分重要的环境因子,其中不同波长的光质对再生体系的建立影响不同^[7]。刘媛等^[8]发现,在不同光质处理下葡萄愈伤的增殖状况不同,刘浩等^[9]经过试验证实不同光质处理下萝卜愈伤组织的诱导、增殖都各不相同。然而目前尚未有研究报道不同光质对喜树组织培养过程中愈伤组织的形成及分化潜质的影响。该试验以喜树无菌苗的茎、叶

为外植体,研究了在蓝、红、白不同的光质下喜树愈伤组织的长势和分化潜质,以期对喜树组织培养和快速繁殖提供基础理论。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 11 月初采自杭州师范大学校园内的喜树种子。采回后的种子置于烧杯中用蒸馏水冲洗干净,于超净工作台加入 70%酒精消毒 30 s,用无菌水清洗 2 次,再用 0.1%升汞消毒 6 min,无菌水清洗 4 次,剥去种皮得到离体胚,接入萌发培养基中,每瓶培养基放置 3~4 个种子,40 d 可获得无菌苗。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 不同光质的光通过日光灯加不同型号的彩色灯光滤色片(煜立舞台灯光设备有限公司)获得,白光来自不加滤光片的光源,主要定义参数见表 1。光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,培养温度(25±1)℃。

表 1 不同光质光源的主要参数

Table 1 Major technique parameters of different light qualities

光源	波长/nm	波长峰值/nm	光强范围/ $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
白光(WL)	410~690	—	7.8~9.8
蓝光(BL)	410~540	435	6.4~8.9
红光(RL)	600~900	660	6.2~8.7

1.2.2 喜树愈伤组织诱导 以长出 4~6 片叶的无菌幼苗为外植体,取约 1 cm 长的茎段和约 1 cm² 的叶片切片各 5 个,分别接种于含 1.0 mg/L NAA+0.075 mg/L TDZ 的 MS、1/2MS、SH 和 WPM 4 种基本培养基上(MS: Murashige and Skoog, 1962; 1/2MS: MS 大量元素减半,其余含量不变;SH: Scken and Hildebrandt, 1972; WPM: Woody Plant Medium, 1933),每种培养基上茎段和叶片分别接种 12 瓶,共 96 瓶,放置于

第一作者简介:陈博(1986-),男,在读硕士,现主要从事植物遗传发育等研究工作。E-mail:chenbo19851128@163.com.

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y3100273;Y3100241)。

收稿日期:2012-05-23

白光(WL)、红光(RL)和蓝光(BL)3种光质下进行培养,每种光质下放置4种培养基各8瓶(叶片和茎段来源外植体各半);3次重复。

1.2.3 酶液的提取 0.5 g 喜树愈伤组织加入 5 mL 预冷的酶提取液,在冰浴下加入少量石英砂和碳酸钙研磨匀浆,转移至 10 mL 容量瓶,用酶提取液定容至 10 mL。取 5 mL 提取液于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,储存在 4℃ 的冰箱中用于酶活力的测定。酶液提取液为 0.05 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液(含 0.3% Triton X-100,3% PVP)。

1.3 项目测定

愈伤组织含水量的测定:含水量(%)=(愈伤组织鲜重-愈伤组织干重)/愈伤组织鲜重。酶活的测定:过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[10];超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑法^[10]。

1.4 数据分析

愈伤组织的含水量、SOD 和 POD 活性数据采用方差分析得出置信区间的概率值 P (Probability value), $P < 0.05$ 认为有显著的统计学差异。

2 结果与分析

2.1 光质及培养基对喜树愈伤组织诱导及长势的影响

喜树愈伤组织的诱导方法虽然已有文献报道,但更多是对激素类别及浓度进行的优化^[11]。选择 MS、1/2MS、SH 和 WPM 4 种不同的培养基,其主要区别在于氮源以及还原态氮含量不同。有报道发现, NH_4NO_3 的含量直接影响体细胞胚的发生,不利于喜树生长和分化^[3]。现结合经过试验获得的最佳激素条件(1.0 mg/L NAA+0.075 mg/L TDZ)来检测愈伤组织的生长情况,结果如图 1 及表 2 所示。通过观察发现,来源于茎段外植体在不同光质和不同培养基上大约都是 23 d 左右出现愈伤组织,而来源于叶片外植体的愈伤组织出现时间较晚,大约在 30 d 左右,多出现于叶柄部位,且无论使用何种条件,愈伤组织的诱导率最终均为 100%。

针对培养了 60 d 左右的愈伤组织进行观察,发现 WPM 培养基更利于愈伤组织的增殖和生物量的积累,但是愈伤组织出现明显的红色(图 1J,K,L),同时也发现在不同光质照射下 1/2MS 培养基上愈伤容易出现紫红色(图 1D,E,F),MS 培养基上出现红色(图 1A,B,C),只有 SH 培养基上的愈伤组织没有出现红色(图 1G,H,I)。同时来自除 SH 以外 3 种培养基的愈伤组织在后续继代过程中褐化现象出现比较频繁,因此认为 SH 培养基更适合愈伤组织的正常生长。

由表 2 可知,愈伤组织在蓝光下的生长状态普遍好于红光及混合光质。可见蓝光更有利于喜树愈伤组织的增殖。

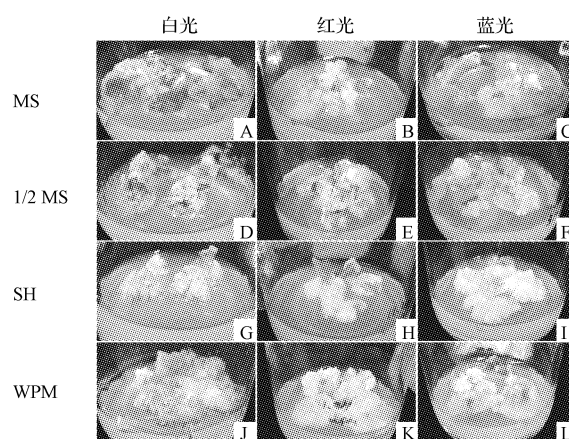


图 1 光质及培养基对喜树愈伤组织的诱导

注:C为MS培养基;D~F为1/2MS培养基;G~I为SH培养基;J~L为WPM培养基。A、D、G、J为白光下诱导情况,B、E、H、K为红光下的愈伤组织,C、F、I、L为蓝光下的愈伤组织。

Fig. 1 Effect of different light quality and medias on the callus induction

表 2 光质及培养基对喜树愈伤组织诱导及长势影响

Table 2 Effect of different light quality and media on the growth vigor of callus induction

光质	培养基	色泽	生长状态
白光	SH	白绿色	+
	WPM	红色	++++
	MS	红绿色	+
	1/2MS	紫红色	—
蓝光	SH	浅绿色	++
	WPM	红绿色	++++
	MS	淡红色偏绿	++
	1/2MS	紫红色偏绿	++
红光	SH	黄白色	+
	WPM	黄白色	++++
	MS	黄白色	—
	1/2MS	黄白色	++

注:生长状态:“++++”最好;“++”较好;“+”一般;“—”较差。

2.2 不同光质对愈伤组织超氧化物歧化酶(SOD)活性影响

SOD 是生物体内普遍存在的一种酶,处于保护酶系中的核心地位。SOD 可有效清除生物体内因细胞成熟和衰老而逐渐增加的自由基,抑制膜内不饱和脂肪酸的过氧化作用,从而维持细胞质膜的稳定性和完整性^[12],有报道称 SOD、超氧阴离子和 H_2O_2 的关系决定着器官的分化,较高的 SOD 酶活性有利于分化^[13]。该试验选择 SH 诱导培养基上生长的愈伤组织来测量蓝、红、白 3 种光质下的愈伤含水量与相关酶的活性。将 SH 培养基中在白光下培养了 60 d 左右的愈伤组织转移至新的 SH 培养基上,分别置于不同的光质条件下进行培养,在培养的第 0、7、14、21 和 28 天检测不同光质下培养的愈伤组织中 SOD 酶的活性,结果如图 2 所示。在单一红光

的照射下愈伤组织中的 SOD 活性始终较低,认为单一红光不利于愈伤组织的进一步分化。蓝光及混合光的照射对 SOD 酶活的影响差异不大,酶活性均于第 7 天达到峰值,并随培养时间的延长而持续下降。据此认为在继代培养后第 7 天左右,混合光下愈伤组织的分化能力达到顶峰,而在混合光质中起主要作用的是蓝光。

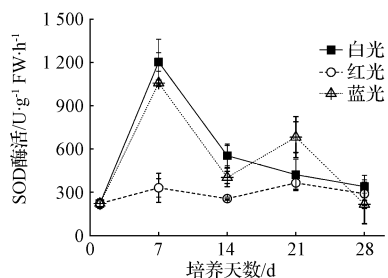


图2 不同光质对愈伤组织中 SOD 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of different light quality on SOD enzyme activity in the callus

2.3 不同光质对愈伤组织过氧化物酶(POD)活性影响

已有人提出 H_2O_2 可能是一种细胞信号传递物质^[14]。崔凯荣等^[13]的研究表明,一定浓度的 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 对枸杞胚性细胞的形成和体细胞胚的发育有促进作用。氧化胁迫与细胞分化有关, SOD、超氧阴离子与 H_2O_2 的关系决定着细胞的分化。因此, H_2O_2 有可能通过细胞的信号传递系统影响基因的调控表达,从而诱导胚性细胞的形成。由于高活性的 SOD 必然产生较高水平的 H_2O_2 , 虽然 H_2O_2 对细胞分裂和分化都有促进作用,但过高浓度的 H_2O_2 又会对愈伤组织起毒害作用,因而需要 POD 来清除。该试验使用同一来源的愈伤组织测定了 POD 的酶活,结果见图 3。在 3 种不同光质下,愈伤组织转移至新鲜 SH 培养基后第 7 天 POD 酶的活性均有下降,其中蓝光下的酶活性最低,仅约为白光下的 1/3;而在第 7~14 天,蓝光下 POD 酶活性显著提高,在 14 d 左右达到培养过程中的峰值。有趣的是,在蓝光照射下,愈伤组织中 POD 酶的活性变化和 SOD 酶的变化正好相反,这与田敏等^[15]对草莓愈伤组织再生研究所得的结论一致。这一结果同样说明了蓝光照射 7 d 左右

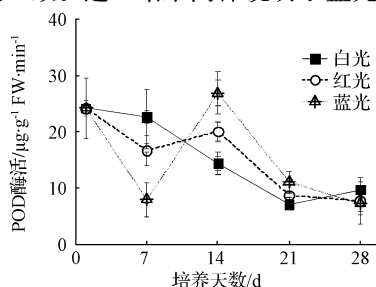


图3 不同光质对愈伤组织中 POD 酶活性的影响

Fig. 3 Effect of different light qualities on POD enzyme activity in the callus

的喜树愈伤组织具备更强的器官分化能力。

2.4 不同光质对喜树愈伤组织含水量的影响

细胞分化过程中郁金香鳞茎分化时含水量逐渐减少^[16],根据上述酶活性测定结果,推测继代后 7 d 时蓝光照射下的愈伤组织分化能力最强,因此进一步称取培养 7 d 的愈伤组织的鲜重和干重,测定不同光质条件下愈伤组织的含水量来予以验证,结果见图 4。蓝光照射下培养 7 d 的愈伤组织中含水量最低,红光与白光下的含水量差异不大;进一步推测继代后第 7 天左右蓝光下培养愈伤组织具备相对红白光更强的细胞分化能力。

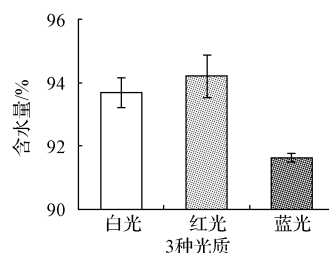


图4 第7天3种光质下的含水量

Fig. 4 Water content of callus under different light qualities at the 7th day

3 讨论与结论

喜树作为一种新兴的药用植物,正在被越来越广泛的开发利用,因而喜树的快速繁殖方法和组织培养技术成为人们关注的重点。然而作为木本植物,喜树不像烟草、草莓等草本植物那样容易建立一套再生体系。目前喜树的愈伤组织诱导已获成功,但缺少对愈伤组织的生长调节和在此基础上分化成苗的系统性报道。

光质作为一种调控手段可以影响植物愈伤组织、器官及原生质体培养过程中的生长、分化、代谢及基因表达等过程^[17]。不同光质对不同材料在植物愈伤的生长、分化中起的作用也不相同。王爱民等^[18]对缙丝花的研究中发现不同光质对侧芽分化及茎的伸长有影响。其中蓝光下诱导芽分化的数目最多,其次是红光和白光。而在王亚丽等^[19]的报道中,红光则表现出可以促进根和芽的分化。

在该试验中,研究了不同光质及培养基对喜树愈伤组织的长势影响,结果显示,愈伤组织在 SH 培养基中的生长状态最佳,1/2MS、MS 和 WPM 培养基上愈伤组织均有不同程度出现红色和淡红色,继代中易出现褐化现象;红、蓝、白光下愈伤组织的生长状态略有差异,蓝光对愈伤组织影响显著,愈伤的生长状况最为快速健康。大量的研究表明光敏色素可能对组织培养的一些形态发生过程起重要的调节作用,其不仅能影响培养物的生物总量,还能影响器官的发生时间和多少^[20]。在对瓜叶菊的研究中发现^[21],绿光下开花最多,蓝光下开花最少;红光下开花时间最长,白光下开花时间最短;而植物干

重方面,红光下干重最大,紫光下干重最小。

在获得愈伤组织后间接诱导不定芽的过程中,合适的愈伤组织转移分化是分化产生不定芽途径的重要环节。愈伤组织形成后,转移过早,细胞壁未降解完全,不能脱分化;转移过晚,愈伤形成褐化失去分化能力。虽然喜树的愈伤组织在诱导培养基上形成后相当长一段时间内形态上几乎没有变化,但是其内部却在进行各种生理生化反应,因此考察其内部的某些生理指标有助于了解愈伤组织的分化潜力。在该试验中,红光照射下愈伤组织的 SOD 值比相对较低,不利于分化增殖,而培养的第 7 天时蓝光下 POD 酶活较低,而 SOD 酶活处于较高水平,由此可以认为在该时段愈伤组织具备潜在的分化趋势。这一结果与枸杞愈伤组织诱导体细胞胚胎发生过程中的酶活变化结果类似^[13]。

根据上述试验结果,认为蓝光照射下 7 d 时喜树的愈伤组织具备较强的潜在分化能力。该试验结果为喜树进一步遗传转化、细胞培养、植株再生提供了新的理论基础。

参考文献

- [1] Wall M E, Wani M C, Cooke E, et al. Plant Antitumor agent. I. the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Am Chem Soc, 1966, 88(16): 3888-3890.
- [2] 姬惜珠, 王红, 张爱军. 木本植物离体快繁中常见问题及解决方法 [J]. 河北果树, 2005(2): 13-14.
- [3] 陈颖, 曹福亮, 李淑娟, 等. 喜树茎段不定芽的诱导及再生系统的建立 [J]. 经济林研究, 2004, 22(1): 8-11.
- [4] 吕立堂, 朱冬雪, 赵德刚. 喜树茎尖组织培养与植株再生 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 682-684.
- [5] 郭勇. 喜树愈伤组织和叶片中喜树碱含量变化研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [6] Wang H M, Zu Y G, Wang W J, et al. Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants [J]. Biol Plant, 2006, 50(4): 725-728.
- [7] Sang H L, Rajesh K T, Kee Y P. Photon flux density and light quality induce changes in growth, tomato development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal plantlets [J]. Plant Cell, Tissorgcult, 2007, 90(3): 141-151.
- [8] 刘媛, 李胜, 马绍英, 等. 肉桂酸和不同光质对葡萄愈伤组织增殖及白藜芦醇果汁的效应 [J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(1): 41-46.
- [9] 刘浩, 李胜, 马绍英, 等. LED 不同光质对萝卜愈伤组织诱导、增殖及萝卜硫素含量的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 347-350.
- [10] 孙群, 胡景江. 植物生理学研究技术 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006.
- [11] 马林. 喜树愈伤组织的诱导与培养 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1273-1276.
- [12] 汪本勤. 植物 SOD 的研究进展 [J]. 河北农业科学, 2008, 12(3): 6-9.
- [13] 崔凯荣, 任红旭, 邢更妹, 等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性的研究 [J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 1998, 34(3): 93-99.
- [14] Burdon R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation [J]. Free Rad Biol and Med, 1993(18): 775-794.
- [15] 田敏, 韩凝, 边红武, 等. 草莓愈伤组织再生能力与活性氧代谢水平相关性研究 [J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 372-374.
- [16] 汪晓谦, 张延龙, 牛立新, 等. 郁金香花芽分化过程中鳞茎碳水化合物和蛋白质含量的变化 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(4): 379-384.
- [17] 崔堂兵, 郭勇, 林炜铁. 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法 [J]. 植物生理通讯, 2001, 37(5): 479-482.
- [18] 王爱民, 肖炜, 杜文雪, 等. 光质对缙丝花试管苗生长发育的影响 [J]. 徐州师范大学学报 (自然科学版), 2001, 19(4): 56-58.
- [19] 王亚丽, 王晓东, 赵兵, 等. 光质对玛咖愈伤组织生长、分化的影响 [J]. 过程工程学报, 2007, 7(4): 784-785.
- [20] 林小苹, 赖钟雄, 黄浅. 光质对植物离体培养的影响 [J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(1): 73-80.
- [21] 谢以萍, 杨再强, 苏天星, 等. 不同光质对瓜叶菊生长发育的影响 [J]. 北方园艺, 2010(3): 53-56.

Effects of Different Light Quality on the Formation and Regenerative Potentialities of Calli of *Camptotheca acuminata*

CHEN Bo, CHEN Zhe-hao, WANG Li-lin, HU Jiang-qin

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036)

Abstract: Taking the stems and leaves of *Camptotheca acuminata* as the explants, the formation and regenerative potentialities of calli from *Camptotheca acuminata* under different light quality (white/blue/red) and four media (SH, MS, WPM and 1/2MS) with 0.075 mg/L TDZ and 1.0 mg/L NAA were studied. The results showed that the calli cultured under blue light on SH medium had the best multiplication conditions. At the 7th day of subculture under blue light, the calli had the highest SOD activity and the lowest POD activity as well as water content, which might suggest a highly potential of regeneration of them. These results provided fundamental basis for the further research of genetic transformation, cell culture, plant regeneration and secondary metabolites acquisition in *Camptotheca acuminata*.

Key words: light quality; callus; regenerative potentiality; *Camptotheca acuminata*