

光温条件对新疆雪莲愈伤组织反应器培养后再分化能力的影响

雷亮^{1,2}, 赵兵¹, 徐春明^{1,2}, 王晓东¹, 王玉春¹

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 研究了光质、光周期、昼夜温差和低温处理时间对反应器大规模培养后的新疆雪莲愈伤组织再分化能力的影响. 实验结果表明, 长波光更有利于愈伤组织的再分化. 光照时间显著影响愈伤组织的再分化能力, 光照时间为 16 h/d 时愈伤组织的分化频率和平均出芽数达到最大, 分别为 76.7% 和 1.8 个/块. 昼夜温差与愈伤组织的再分化能力呈显著负相关. 与水母雪莲不同, 低温处理并不利于新疆雪莲愈伤组织的再分化. 新疆雪莲愈伤组织的再分化能力与同工酶的种类和活性密切相关.

关键词: 新疆雪莲; 反应器; 再分化; 光照; 温度; 过氧化物酶同工酶

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)06-0942-06

1 前言

新疆雪莲(*Saussurea involucreta* Kar. et Kir.)又名天山雪莲、雪荷花、大苞雪莲, 属菊科凤毛菊属, 是我国西部高山地区特有的药用植物, 具有抗炎镇痛、活血通经、散寒除湿等多种药理作用, 多用于风湿性关节炎、经血不调、宫寒腹痛、肺寒咳嗽及高山不适症的治疗^[1,2]. 由于近年来野生雪莲乱采滥挖现象严重, 人工栽培困难, 野生种源极度缺乏, 现已被列为国家 3 级濒危物种. 由于反应器培养植物细胞具有占地少、规模大、培养获得的愈伤组织同步性好、节约人力资源等特点, 因此是植物快繁规模化、产业化的有效途径. 利用生物反应器对新疆雪莲愈伤组织进行大规模悬浮培养及培养后再分化进行快速繁殖用于人工种植, 既可保护野生资源, 又可以满足日益增长的市场需求. 到目前为止, 已对水母雪莲愈伤组织反应器悬浮培养生产次级代谢产物进行过较多研究^[3,4], 对固体培养的新疆雪莲愈伤组织及毛状根的分化诱导进行快速繁殖也有报道^[5-7]. 但对新疆雪莲愈伤组织反应器大规模培养后再分化诱导研究目前尚未见报道. 本研究对影响新疆雪莲愈伤组织反应器大规模培养后再分化能力的主要因素进行了探讨.

光照和温度是影响植物生长和发育的重要因素. 在植物愈伤组织的发育与再分化过程中, 光照和温度条件的变化诱导愈伤组织内过氧化物酶同工酶在转录或转录后水平的表达调控, 从而对植物的生长分化情况进行调节^[8,9]. 本工作研究了光质、光周期、昼夜温差和低温处理时间对反应器培养后的新疆雪莲愈伤组织再分化生芽的影响, 并首次将过氧化物酶同工酶的分析引入新疆雪莲愈伤组织的分化诱导研究, 揭示了过氧化物酶

同工酶不同种类和活性变化与新疆雪莲愈伤组织的再分化能力的相关关系.

2 实验

2.1 材料

新疆雪莲种子采自新疆巴里坤, 经表面消毒后培养无菌苗, 取苗龄 25 d 的无菌苗作为外植体, 在附加 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 2 mg/L、蔗糖 30 g/L 的 MS 固体培养基上诱导产生愈伤组织. 将诱导出的愈伤组织接种于内装 2 L 液体培养基的 2.5 L 反应器中进行培养, 所得愈伤组织用于新疆雪莲愈伤组织的再分化研究.

2.2 反应器培养参数

本实验的研究材料均为反应器培养后的新疆雪莲愈伤组织, 培养用反应器为本实验室自行设计的带有锥形筛网底的改进型鼓泡式反应器, 装置如图 1. 在前期工作中, 已得出反应器最佳操作条件为通气量 0.4 L/min, 培养温度(23±0.5) °C, 光照强度 36.5 μmol/(m²·s),

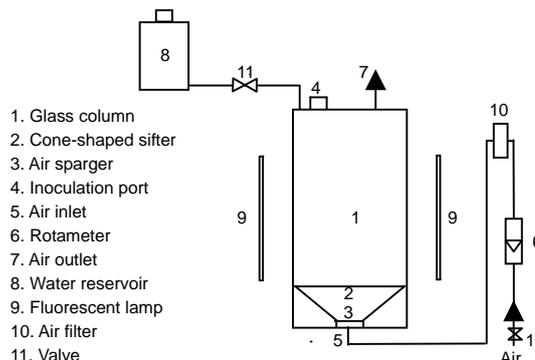


图 1 2.5 L 改进型鼓泡式生物反应器装置图
Fig.1 Schematic diagram of 2.5 L improved bubble column

收稿日期: 2005-12-30, 修回日期: 2006-03-17

基金项目: 中国科学院西部行动高新技术基金资助项目(编号: KGCX2-SW-506)

作者简介: 雷亮(1982-), 女, 蒙古族, 内蒙古宁城县人, 硕士研究生, 生物化工专业; 王晓东, 通讯联系人, Tel: 010-82627059, E-mail: xdwang@home.ipe.ac.cn.

光照时间 16 h/d. 培养基选用附加 6-BA 0.5 mg/L, NAA 2 mg/L 和蔗糖 30 g/L 的 MS 液体培养基.

2.3 再分化诱导

在超净台中将反应器培养 21 d 的愈伤组织接入附加 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L、蔗糖 30 g/L 的 MS 固体培养基诱导分化出芽, 以下如无特别说明, 培养条件均为白光光强 36.5 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照时间 16 h/d, 培养温度(20 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$. 30 d 后统计出芽情况.

分化频率=(出芽愈伤组织块数/接种愈伤组织块数) \times 100%,

平均出芽数=各块愈伤组织出芽总数/接种愈伤组织块数.

2.4 过氧化物酶同工酶分析

取新疆雪莲小块愈伤组织, 加过氧化物酶同工酶提取液^[10], 冰浴、研磨匀浆, 3000 r/min 下冷冻离心 20 min,

取上清液进行电泳. 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 分离胶浓度 10%, 浓缩胶浓度 4%, 电极缓冲液为 Tris-Gly 系统(pH 8.7), 进样量 20 μL , 稳流 20 mA, 0.2% 溴酚蓝作为指示剂, 时间 3~4 h. 电泳结束后采用醋酸-联苯胺染色法进行染色并拍照^[10].

3 结果与讨论

3.1 光质对出芽数和分化频率的影响

将反应器悬浮培养后的新疆雪莲愈伤组织分别在白光、红光、黄光、蓝光和绿光照射下诱导分化出芽, 发现在中长波光照射下愈伤组织的分化情况较好, 优于白光, 短波长下分化情况劣于白光培养(图 2), 其中在黄光照射下分化频率最高(85%), 红光下平均出芽数最高(2.2 个/块), 这与 Kadkade 等^[11]的研究结果一致.

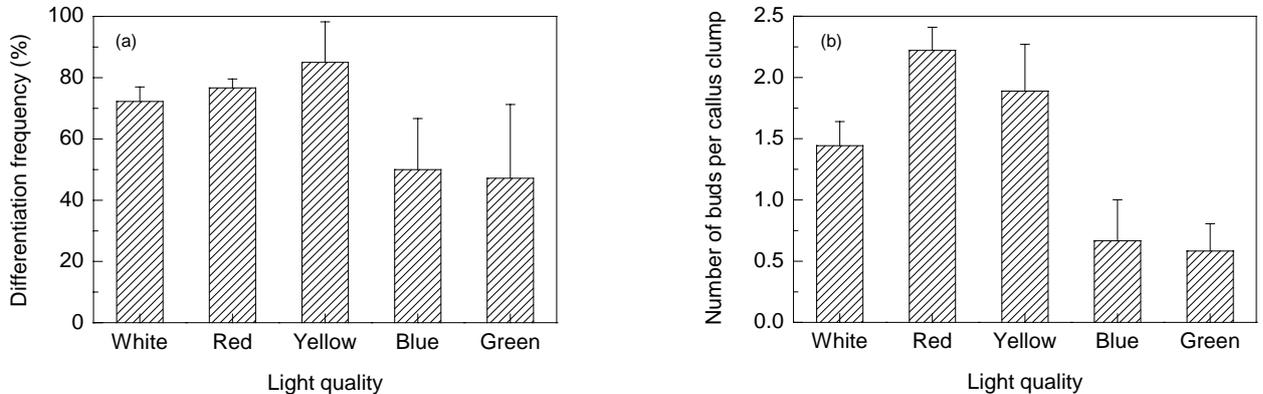


图 2 光质对分化频率和出芽数的影响

Fig.2 Redifferentiation of *S. involucreta* callus cultured with different light qualities

表 1 不同光源的主要技术参数

Table 1 Main parameters of different lamps

Light spectral quality	White light	Red light	Yellow light	Blue light	Green light
Range of wavelength (nm)	380~780	610~715	530~790	380~560	480~670
Half-height bandwidth (nm)	-	15	90	85	50
Peak value of wavelength (nm)	-	658	600:632 (two peaks)	435	520

光作为一种物理因子已广泛用于植物组织培养过程中的形态发生、生长控制、光形态建成反应及其各种反应机理的研究. 植物通过光受体接收光信号(包括光质、光强、光照方向和光照时间等)来调节生长、分化和代谢^[12]. 在高等植物体内至少存在 3 种光受体, 它们对不同的光谱有不同的选择性吸收, 3 种光受体及其敏感波长 λ 分别为: Phytochrome ($\lambda>520$ nm, red/far red), Cryptochrome ($\lambda=340\sim520$ nm, blue/UV-A; $\lambda=290\sim350$ nm, UV-B). 其中 Phytochrome 表现为两种形式 P_r 和 P_{fr} , 在光照条件下, P_r 转变为其活化形式 P_{fr} , 它能影响愈伤组织内分化相关酶活性及其基因表达^[13]. 由表 1 可以看到, 红光、黄光的波长范围恰好与光受体 Phytochrome

的敏感波长范围接近, 因此, 在红光/黄光照射下, 更多的 P_r 转变为 P_{fr} , 促进了相关酶活性的提高, 从而增加了新疆雪莲愈伤组织的分化.

3.2 光周期对出芽数和分化频率的影响

新疆雪莲愈伤组织的分化频率和平均出芽数随光照时间的延长而增加, 在光照时间为 16 h/d 时达到最大, 分别为 76.7% 和 1.8 个/块(图 3). 当光照时间大于 16 h/d 时, 愈伤组织的分化频率和平均出芽数随光照时间的延长有所下降, 这与野生新疆雪莲在自然状态下在长日照地区生长的生物节律吻合. 在持续光照下愈伤组织的分化能力反而下降, 说明昼夜交替是新疆雪莲愈伤组织分化所需要的, 这与绿豆的植株再生情况相反^[14]. 在暗培

养条件下(即光照时间为 0 h/d), 愈伤组织虽然会有一定分化, 但分化能力很低, 而且在此条件下进行分化获得的再生苗为白色半透明状的黄化苗, 苗质脆弱易断, 成活率极低, 说明暗培养条件不适于新疆雪莲分化出芽。

一般地, 随光照时间的延长, P_{fr} 在 Phytochrome 中的比例增加, 相关酶活性提高, 因此选择长光照时间有助于提高植物愈伤组织的分化能力。但对于一些光照敏

感植物, 在持续光照条件下, 由于光子能量超过了 CO_2 的同化作用, 将会产生光抑制效应(Photoinhibition)^[15], 光电子通过光合体系 II(Photosystem II, PS II)进行传递, 产生大量氧自由基, 使光受体的超微结构遭到破坏, 造成 P_{fr} 下降, 表现为愈伤组织的分化能力下降, 新疆雪莲愈伤组织的分化情况即属于此。

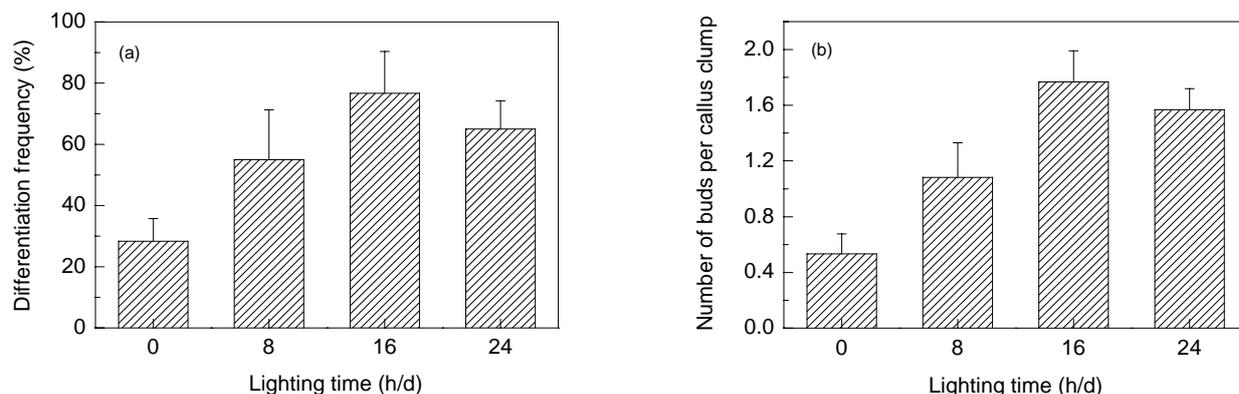


图3 光照时间对分化频率和出芽数的影响

Fig.3 Effect of lighting time per day on the redifferentiation of *S. involucrata* callus

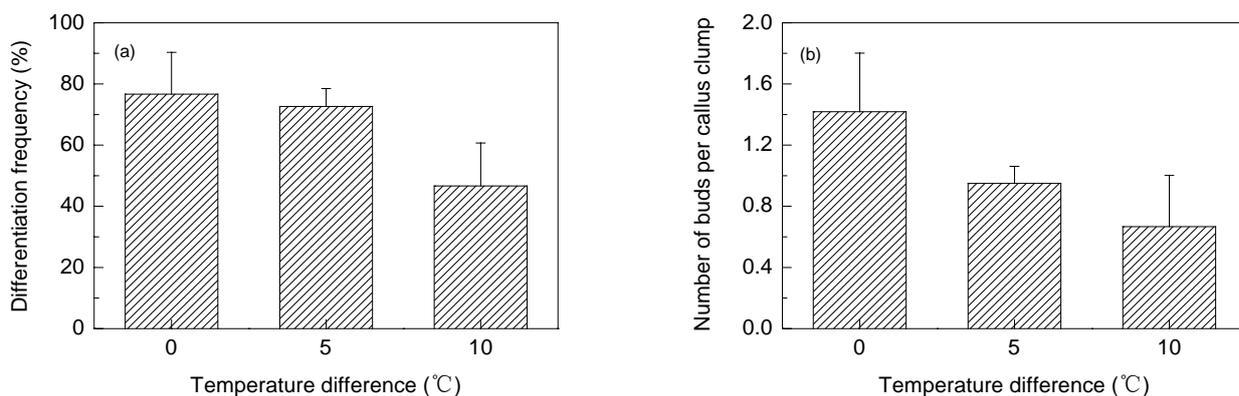


图4 昼夜温差对分化频率和出芽数的影响

Fig.4 Effect of temperature difference between day and night on the redifferentiation of *S. involucrata* callus

3.3 昼夜温差对出芽数和分化频率的影响

考虑到新疆雪莲的原产地新疆巴里坤地区属于典型大陆性气候, 具有日照时间长、昼夜温差大的特点, 因此在反应器培养后的再分化研究中考察了温差对愈伤组织分化的影响, 结果见图 4。将反应器悬浮培养后的新疆雪莲愈伤组织分别在不同温差的人工气候箱中培养, 采用白光照射, 照射时间 16 h/d, 白天温度设定为 20℃, 夜间温度则分别设置为 10, 15, 20℃。实验结果表明, 昼夜温差大小对愈伤组织的分化能力有显著的影响, 二者呈负相关。当昼夜温差为 0℃(即夜间温度与昼间温度相同, 均为 20℃)时, 新疆雪莲的分化最好, 分化频率和平均出芽数分别为 76.7%和 1.4 个/块, 说明

在雪莲愈伤组织的脱分化-再分化过程中, 新疆雪莲已失去对昼夜温差的适应性。

3.4 低温处理时间对出芽数和分化频率的影响

温度是影响植物生长、发育及光合作用的主要因素之一。适当的低温可以降低一些植物 PS II 传递的光电子流量, 促进分化相关酶的合成。但对另一些植物, 低温将降低 CO_2 的同化作用, 导致大量氧自由基的形成, 致使细胞超微结构遭到破坏, 造成愈伤组织分化能力下降^[17]。在水母雪莲的再分化条件研究中^[16], 曾发现低温处理是水母雪莲愈伤组织再分化的关键条件, 因此在本实验中研究了低温处理时间对新疆雪莲愈伤组织再分化的影响, 结果见图 5。将反应器培养后的新疆雪莲愈

伤组织在 4℃ 下分别处理 5, 10, 15 d 后转移到 20℃ 人工气候箱中进行分化培养, 实验结果表明不同的低温处理时间对新疆雪莲愈伤组织的再分化能力有显著的影响, 其中低温处理时间为 10 d 时愈伤组织的分化最好, 分化频率和平均出芽数分别为 38.3% 和 0.6 个/块. 处理时间为 15 d 时愈伤组织的分化能力大大降低, 说明长时间的

低温处理影响了愈伤组织的分化. 将图 5 的结果与图 2~4 中未经低温处理的、其他培养条件相同的愈伤组织分化情况比较可以发现, 经过低温处理的愈伤组织分化能力远低于未经低温处理的愈伤组织, 说明新疆雪莲与水母雪莲在再分化机理上存在明显的种间差异.

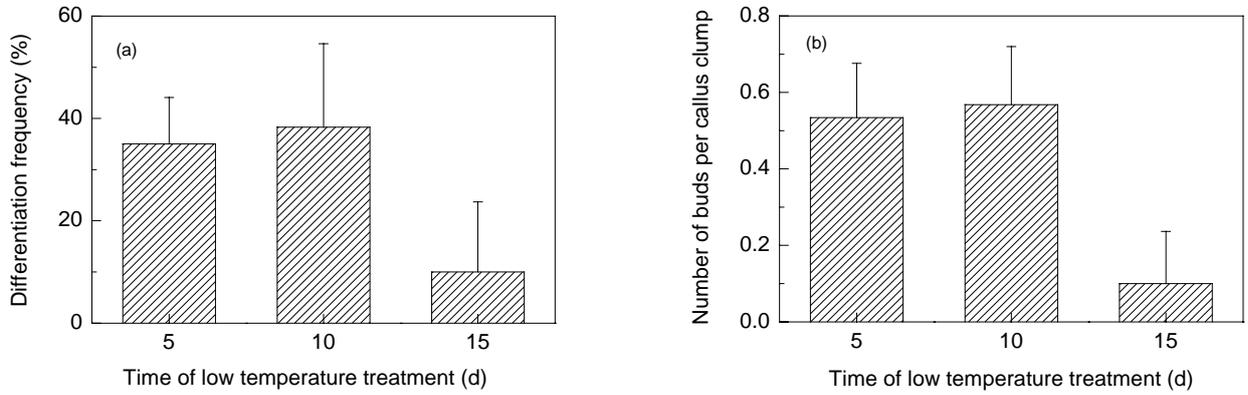


图 5 低温处理时间对分化频率和出芽数的影响

Fig.5 Redifferentiation of *S. involucrata* callus cultured with different time of low temperature treatment

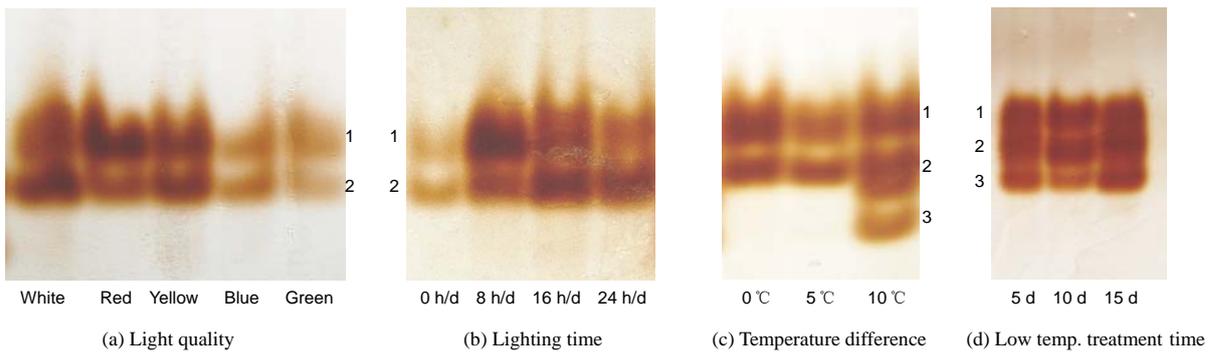


图 6 不同光质、不同光周期、不同昼夜温差和不同低温处理时间下培养的愈伤组织的过氧化物酶同工酶谱
Fig.6 Electrophoresis zymogram of peroxidase isozymes in the callus of *S. involucrata* with different light qualities, lighting time, temperature difference between day and night, and low temperature treatment time (1. POD I, 2. POD II, 3. POD III)

3.5 愈伤组织再分化能力与过氧化物酶同工酶谱的关系

过氧化物酶(Peroxidase, POD)是广泛存在于植物体内的一类与生物合成、分解密切相关的酶, 可催化芳香环、酚类、胺类及吡啶类物质的氧化反应, 被认为是木质化作用或组织分化的标志酶^[18-20], 其同工酶种类及活性的改变被看作是根芽分化及胚状体发生的一个指示酶. 在荞麦、黄瓜、番茄、党参等多种植物的愈伤组织分化研究中^[21-23]曾作为愈伤组织分化状况的指标. 本实验过程中发现, 新疆雪莲愈伤组织反应器培养后的分化能力与愈伤组织中的过氧化物酶同工酶的活性和种类有一定相关性, 因此在本研究中取不同的光质、光周期、昼夜温差和低温处理时间下培养的愈伤组织进行了过氧化物酶同工酶谱分析, 以便为优化新疆雪莲愈伤组

织反应器培养后的分化诱导条件提供依据.

由图 6 可以看出, 在不同光质、不同光周期下培养的愈伤组织中同工酶种类并无差别, 均为 2 条谱带(POD I, POD II), 但活性差别显著. 在白光、红光、黄光下培养的各同工酶活性均大大高于短波长光蓝光和绿光下培养的愈伤组织[图 6(a)]. 在光照时间为 0 h/d 时, 愈伤组织中的酶活非常低, 这从生化角度反映了暗培养下新疆雪莲愈伤组织分化能力弱的原因[图 6(b)]. 另外综合比较两图可以看出, 第 2 条酶带显著的愈伤组织更倾向于获得较高的分化频率和出芽数.

温差对过氧化物酶同工酶种类的影响更为显著. 当选用较低的昼夜温差时同工酶有 2 条谱带出现, 这与前面的恒温培养情况一致. 但当昼夜温差大到一定程度

(相差 10℃)时,有新的同工酶谱带出现[POD III, 图 6(c)]. 另外经过低温处理[图 6(d)]的愈伤组织全部有 3 条谱带出现(POD I, POD II, POD III), 说明第 3 条谱带 POD III 与低温环境密切相关. 这可能是因为低温导致大量氧自由基形成, 诱导植物体内的抗氧化机制启动, 使相应的 POD 酶同工酶得以表达, 以清除对细胞生长不利的氧自由基^[17]. 此时愈伤组织的分化能力大大降低, 也可能与第 3 条谱带的出现有关.

4 结论

通过对最佳反应器培养条件下获得的新疆雪莲愈伤组织在不同光温条件下的分化诱导研究, 可以得出下述几个主要结论:

(1) 光质和光周期是影响反应器培养后的新疆雪莲愈伤组织再分化的重要因素. 与白光相比, 长波长光更有利于愈伤组织的再分化, 短波长光的作用则恰好相反, 其中在黄光照射下分化频率最高(85%), 红光下平均出芽数最高(2.2 个/块), 在以快速繁殖为目的的研究中, 主要考虑光照温度条件对平均出芽数的影响, 因此选择红光较为合适. 随着光照时间的延长, 愈伤组织的平均出芽数和分化频率大大增加, 并在光照时间 16 h/d 时达最大, 分别为 1.8 个/块和 76.7%. 在持续光照条件下愈伤组织的分化能力反而下降, 说明昼夜交替是愈伤组织分化所需要的. 暗培养不适于新疆雪莲的分化出芽.

(2) 昼夜温差大小与愈伤组织的分化能力呈负相关, 当昼夜温差为 0℃时新疆雪莲的分化最好, 分化频率和平均出芽数分别为 76.7%和 1.4 个/块, 说明在雪莲愈伤组织的脱分化-再分化过程中, 新疆雪莲已失去对昼夜温差的适应性. 长时间的低温处理不利于愈伤组织的分化. 与水母雪莲不同, 低温处理并不利于新疆雪莲的再分化, 显示二者种间差异较显著.

(3) 新疆雪莲愈伤组织的分化与愈伤组织内过氧化物酶同工酶的活性、种类是密切相关的. POD I, POD II, 尤其是 POD II 谱带的愈伤组织分化明显较好, 而 POD III 谱带的愈伤组织分化较差. 这一结果表明过氧化物酶同工酶活性和种类的变化可以作为新疆雪莲愈伤组织生长分化状态的生理生化指标.

参考文献:

[1] 卫生部药品生物制品检定所. 中国民族药志, 第 1 卷 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 444.
[2] 袁晓凡, 赵兵, 王玉春. 雪莲的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1424-1426.
[3] Yuan X F, Zhao B, Wang Y C. Cell Culture of *Saussurea medusa* in a Periodically Submerged Air-lift Bioreactor [J]. Biochem. Eng. J., 2004, 21: 235-239.

[4] 黄艳, 赵德修, 吕东平, 等. 搅拌式生物反应器悬浮培养水母雪莲细胞的研究 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(5): 561-565.
[5] 瓦·古巴诺娃, 刘杰龙, 石玉珊. 新疆雪莲的组织培养 [J]. 新疆农业科学, 1990, (5): 221-222.
[6] 武利勤, 郭顺星, 肖培根. 新疆雪莲胚芽的组织培养和植株再生 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(11): 814-816.
[7] 付春祥, 金治平, 杨睿, 等. 新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 366-371.
[8] Ma L G, Li J M, Qu L J, et al. Light Control of *Arabidopsis* Development Entails Coordinated Regulation of Genome Expression and Cellular Pathways [J]. Plant Cell, 2001, 13(12): 2589-2607.
[9] Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the Expression Pattern of 1300 *Arabidopsis* Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-length cDNA Microarray [J]. Plant Cell, 2001, 13(1): 61-72.
[10] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 175-178.
[11] Kadkade P G, Jopson H. Influence of Light Quality on Organogenesis from the Embryo-derived Callus of Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*) [J]. Plant Sci. Lett., 1978, 13(1): 67-73.
[12] Wang Y C, Zhang H X, Zhao B. Improved Growth of *Artemisia annua* L Hairy Roots and Artemisinin Production under Red Light Conditions [J]. Biotechnol. Lett., 2001, 23: 1971-1973.
[13] Mohr H, Schopfer P. Plant Physiology. [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 345-369.
[14] Prathibha D, Radha P, Sitamahalakshmi L, et al. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Mung Bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] [J]. Sci. Hort., 2004, 99(1/2): 1-8.
[15] Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, et al. Effects of Different Irradiance Levels on Some Antioxidant Enzymes and on Malondialdehyde Content during Rewatering in Olive Tree [J]. Plant Sci., 2004, 166(2): 293-302.
[16] 陈发菊, 赵德修. 水母雪莲愈伤组织的多态性及其再分化条件的研究 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2000, (3): 331-335.
[17] Ali M B, Hahn E J, Paek K Y. Effects of Temperature on Oxidative Stress Defense Systems, Lipid Peroxidation and Lipoyxygenase Activity in *Phalaenopsis* [J]. Plant Physiol. Biochem., 2005, 43(3): 213-223.
[18] Fukuda H, Komainc A. Lignin Synthesis and Its Related Enzymes as Markers as Trachearyelement Differentiation in Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans* [J]. Planta, 1982, 155(4): 423-430.
[19] Lampert A. Role for Peroxidases in Cell Wall Genesis [A]. Greppin H, Penel C, Gasper T. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases [C]. Switzerland: University of Geneva, 1986. 199-208.
[20] Valério L, De Meyer M, Penel C, et al. Expression Analysis of the *Arabidopsis* Peroxidase Multigenic Family [J]. Phytochemistry, 2004, 65(10): 1331-1342.
[21] 王维荣, 王咏东, 欧阳光察, 等. 光质对黄瓜及番茄愈伤组织培养中分化和有关酶的影响 [J]. 植物生理学报, 1991, 17(2): 118-124.
[22] 郝建平, 裴雁曦, 曲运波. 荞麦愈伤组织分化与过氧化物酶活性及其同工酶关系的研究 [J]. 木本植物研究, 2000, 20(4): 416-419.
[23] 潘有福, 王仑山, Rajesh K T, 等. 党参的体细胞胚发生及不同发育阶段几种同工酶的分析 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(1): 1-7.

Effects of Light and Temperature on the Redifferentiation of *Saussurea involucrata* Callus Cultured in the Bioreactor

LEI Liang^{1,2}, ZHAO Bing¹, XU Chun-ming^{1,2}, WANG Xiao-dong¹, WANG Yu-chun¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A series of experiments were carried out to study the effects of light quality, light time, temperature difference between day and night, and time of low temperature treatment on the redifferentiation of *Saussurea involucrata* callus after the callus culture in a bioreactor. Compared with short wavelength light, long wavelength light led to high redifferentiation. The redifferentiation frequency of callus increased with the lighting time. The maximal redifferentiation frequency was obtained with daily lighting 16 h/d. The temperature difference between day and night was negatively correlative to the callus redifferentiation. Low temperature treatment was not necessary to the redifferentiation. The peroxidase isoenzyme analysis indicated that the redifferentiation frequency of the callus was closely related to the quantity and kinds of the peroxidase isoenzymes.

Key words: *Saussurea involucrata*; bioreactor; redifferentiation; light; temperature; peroxidase isoenzymes