

盐胁迫对长春花愈伤组织生长及阿玛碱积累的影响

向蓓蓓, 朱晔荣, 王文娟, 王 勇*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 目的 研究盐胁迫对长春花愈伤组织生长及阿玛碱积累的影响。方法 用浓度为 0、50、100、150 mmol/L 的 NaCl 处理长春花愈伤组织, 测定其鲜质量、干质量、丙二醛 (MDA) 量、光合速率、呼吸速率等生理指标和阿玛碱的量。结果 盐胁迫显著地降低了长春花愈伤组织的鲜质量和干质量, 提高了 MDA 量、光合速率和呼吸速率; 在含有不同浓度 NaCl 的培养基上生长 30 d 后, 愈伤组织的阿玛碱量随 NaCl 浓度的增加而逐渐降低; 用不同浓度的 NaCl 溶液喷洒生长 27 d 的愈伤组织, 发现 3 d 后 50 mmol/L 处理的愈伤组织中阿玛碱量比对照高出近 1 倍。结论 长期盐胁迫能够抑制长春花愈伤组织的生长, 同时引起阿玛碱积累的减少; 低浓度 NaCl 喷洒处理则对长春花细胞中阿玛碱的积累有较大的促进作用。

关键词: 长春花; 愈伤组织, 盐胁迫; 阿玛碱; NaCl

中图分类号: R282.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)01-0167-04

Effects of salt stress on growth and ajmalicine accumulation of *Catharanthus roseus* calli

XIANG Bei-bei, ZHU Ye-rong, WANG Wen-juan, WANG Yong

College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; callus; salt stress; ajmalicine; NaCl

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 为夹竹桃科多年生草本植物, 是一种名贵的药材。长春花细胞内含有多种吲哚生物碱, 如长春碱、长春新碱、阿玛碱、长春质碱等, 其中长春碱和长春新碱是目前应用最广泛的天然植物抗肿瘤药物, 阿玛碱可用于治疗高血压、心律不齐, 具有镇静、促血管扩张和抗菌等作用。近年来阿玛碱的药理学研究, 引起了人们的兴趣。

目前的研究主要从天然植物中提取长春花药用成分, 但因其量甚微, 所以提取成本很高。与常规栽培相比, 细胞培养具有许多优点^[1-2], 它不受地区、季节、土壤及有害生物影响; 细胞生长和代谢过程的合理调节有助于降低成本和提高生产率; 有利于细胞筛选、生物转化、寻找新的药用成分; 个体差异小, 实验周期短, 设备简单, 便于研究并能节省人力、物力等。长春花细胞培养现已成为研究吲哚生物碱生物合成的模式系统^[3], 有关长春花细胞工程的研究国外有大量报道^[4]。在长春花细胞和组织培养物中共发现了 60 多种次生代谢产物, 其中阿玛

碱是主要产物之一, 因此与传统从长春花植株中提取阿玛碱相比, 运用大规模的长春花细胞培养方法生产阿玛碱更有优势。

植物生长环境中的温度、水分、光照、盐分和养分等都会对植物的生长产生影响, 其中包括胁迫^[5]。环境胁迫可以影响植物的次生代谢。因此, 通过改变环境条件以达到提高长春花生物碱量的研究一直受到重视并取得一些有参考价值的结果。王景艳等^[6]用低浓度的 NaCl 胁迫提高了长春花幼苗中生物碱的量, 赵剑等^[7]用 NaCl 处理长春花悬浮细胞, 发现可以促进阿玛碱的分泌。

本实验以长春花愈伤组织为材料, 研究胁迫下长春花愈伤组织的生长和阿玛碱量的变化, 以揭示盐胁迫对细胞培养的影响, 同时亦为通过改变环境因子来提高其生物碱量提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料与处理

实验材料为本实验室诱导的稳定生长的愈伤组织。一组实验是将愈伤组织接种在含有 0 (对照)、

收稿日期: 2010-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30700426)

作者简介: 向蓓蓓 (1983—), 女, 山东省聊城市人, 南开大学植物学博士研究生, 长期从事药用植物的生理和分子生物学的研究。

Tel: (022)23504382 E-mail: xiangbeibei@mail.nankai.edu.cn

*通讯作者 王 勇

50、100、27 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照时间 12 h/d) 中培养, 30 d 后测定鲜质量、干质量、MDA 和阿玛碱的量; 另一组实验是待愈伤组织生长 27 d 后, 用 0、50、100、150 mmol/L 的 NaCl 溶液均匀喷洒愈伤组织, 3 d 后测定光合速率和呼吸速率及阿玛碱的量。每种处理至少 3 个重复。

1.2 愈伤组织鲜质量和干质量的测定

收集愈伤组织, 直接称取每瓶的鲜质量, 然后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至质量无变化, 称定干质量。

1.3 MDA 的测定

参照《植物生理生化实验原理和技术》^[8]进行测定。

1.4 光合速率和呼吸速率的测定

利用英国 DW/1 型氧电极 (Hansatech Ltd, King's Lynn, Norfolk, 英国) 在 1 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下测定长春花愈伤组织光合放氧速率和暗下测定呼吸速率。电极反应池为 2 mL 的密闭系统, 光源为红色发光二极管, 光强大小由软件控制, 通过 QRT1 型光子计标定。整个过程由 Oxy2lab 程序控制, 并记录数据。

1.5 阿玛碱的提取和测定

生物碱的提取及测定参照王宁宁等^[9]的方法进行。阿玛碱的测定采用 RP-HPLC 法, 色谱条件: C_{18} 硅胶柱 (250 mm \times 4.6 mm, 7 μm); 测定波长 280 nm, 流动相甲醇-5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (7 : 3, pH 7.0); 柱温 28 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min。

1.6 数据分析

采用 Excel、SPSS 等数据分析软件处理数据。

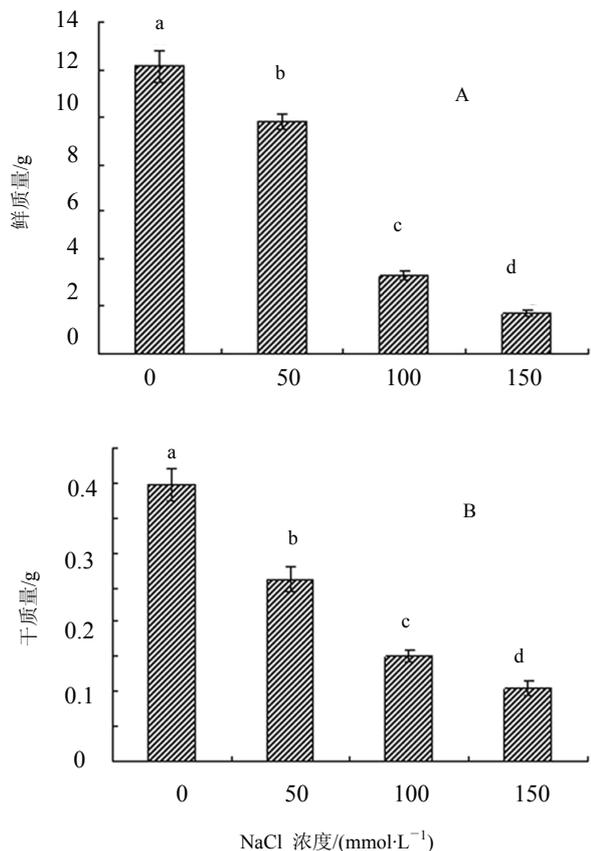
2 结果

2.1 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织生长的影响

用 0、50、100、150 mmol/L 的 NaCl 的培养基分别培养长春花愈伤组织, 结果表明 (图 1), 培养 30 d 后, 当 NaCl 浓度大于 50 mmol/L 时对愈伤组织的生长表现出抑制作用, 且随着盐浓度的增加, 抑制作用增强。当 NaCl 浓度达到 100 mmol/L 时, 愈伤组织的生物量减少到对照的 40% 左右; 在 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时, 愈伤组织的生长几乎停止, 完全褐化。用不同浓度的 NaCl 溶液喷洒生长 27 d 的愈伤组织, 3 d 后收获。由于在愈伤组织生长到 27 d 后, 生物量已经达到平台期, 鲜质量和干质量无明显变化。

2.2 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织 MDA 量的影响

用含有不同浓度 (0、50、100、150 mmol/L NaCl)



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different lower case letters indicate significant differences ($P < 0.05$), same as below

图 1 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织鲜质量(A)和干质量(B)的影响

Fig. 1 Effect of NaCl stress on fresh weight (A) and dry weight (B) of *C. roseus* calli

的培养基培养长春花愈伤组织, 愈伤组织中 MDA 量变化见图 2。培养 30 d 后, 当 NaCl 浓度大于 50 mmol/L 时对愈伤组织的 MDA 量表现出促进作用, 且随着盐浓度的增加, 促进作用增强。当 NaCl 浓度达到 100 mmol/L 时, 愈伤组织的 MDA 量增加到对照的 2 倍左右; 在 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时, 愈伤组织 MDA 量的增加几乎停止。MDA 是膜质过氧化的主要产物之一, 其量可以表示膜质过氧化的程度^[10]。本实验表明当 NaCl 浓度在 100 mmol/L 时, 盐胁迫已经给细胞生长造成严重损伤。MDA 量的变化同细胞膜透性的变化基本一致, 也进一步说明了随盐胁迫强度的增大, 加速了膜损害的进程。

2.3 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织光合速率和呼吸速率的影响

用不同浓度的 NaCl 溶液喷洒生长 27 d 的愈伤组织, 3 d 后长春花愈伤组织的光合速率和呼吸速率

的变化见图 3, 用 50 或 100 mmol/L NaCl 短期喷施, 愈伤组织的光合速率和呼吸速率与对照相比没有显著差异。在 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时, 愈伤组织的光合速率和呼吸速率有显著提高 ($P < 0.05$)。光

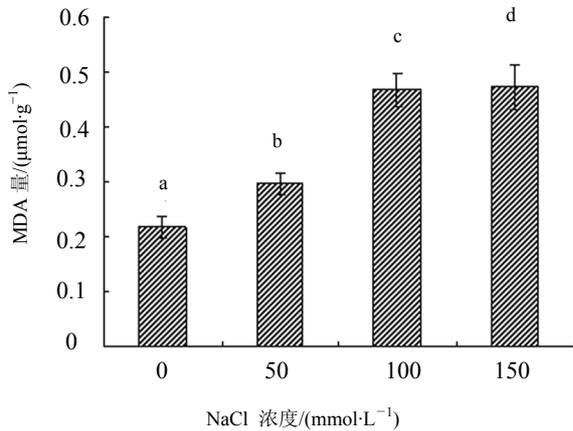


图 2 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织 MDA 量的影响

Fig. 2 Effect of NaCl stress on MDA content of *C. roseus* calli

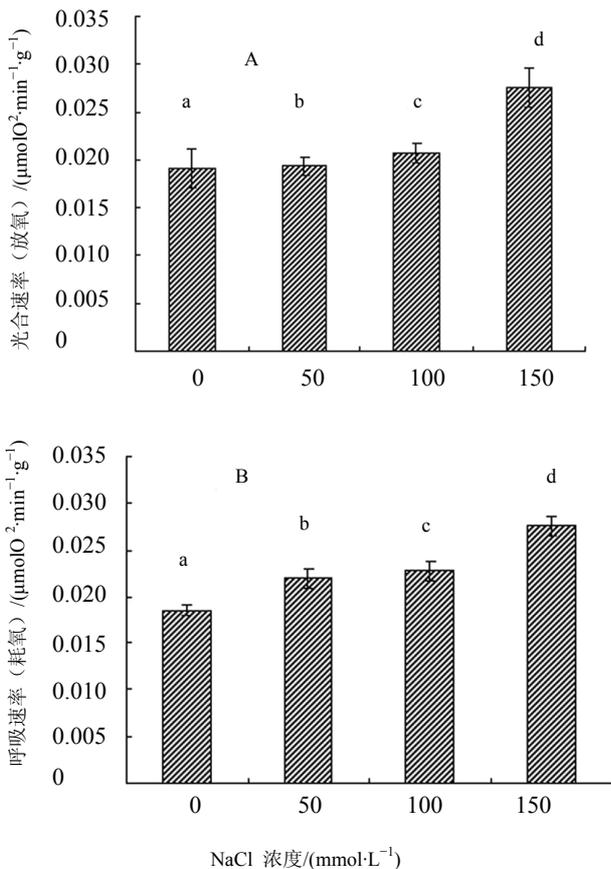


图 3 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织光合速率(A)和呼吸速率(B)的影响

Fig. 3 Effect of NaCl stress on photosynthetic rate (A) and respiration rate (B) of *C. roseus* calli

合速率和呼吸速率的提高可能是植物适应盐胁迫的一种表现, 光合速率的提高有利于同化物积累, 促进能量转化, 为离子吸收和主动运输提供能量, 从而在一定程度上, 抑制盐离子进入细胞内, 缓解盐离子对细胞的毒害, 维持细胞内离子稳态。植物积累或拒绝盐离子, 合成有机渗透物适应或抵抗盐胁迫等一系列过程都需要消耗大量能量, 因此呼吸速率也有所提高。

2.4 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织中阿玛碱量的影响

用不同浓度 0、50、100、150 mmol/L 的 NaCl 的培养基培养长春花愈伤组织, 结果表明 (图 4), 培养 30 d 后, 当 NaCl 浓度大于 50 mmol/L 时对愈伤组织的阿玛碱的量表现出抑制作用, 且随着盐浓度的增加, 抑制作用增强。当 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时, 愈伤组织中的阿玛碱的量减少到对照的 15% 左右。长期盐胁迫处理愈伤组织可能降低了合成阿玛碱的关键酶的活性, 从而使阿玛碱的量降低。苏虎等^[1]发现长期的盐胁迫对草珊瑚愈伤组织的毒害作用较大, 这使得盐胁迫组总黄酮合成周期明显缩短, 在第 30 天时 100 mmol/L 胁迫组已检测不到总黄酮。这也说明了次生代谢产物在植物体内的合成和积累是一定的环境条件诱导作用的结果。

用不同浓度的 NaCl 溶液喷洒生长 27 d 的愈伤组织 (图 5)。当 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时, 愈伤组织中阿玛碱量比对照组高出近 1 倍; 当 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时, 愈伤组织中阿玛碱的量与对照组相比表现出抑制作用。这一结果与王景艳等^[6]得出的结果相似。因此, 适当浓度的盐处理可以增长长春花愈伤组织中阿玛碱的量。

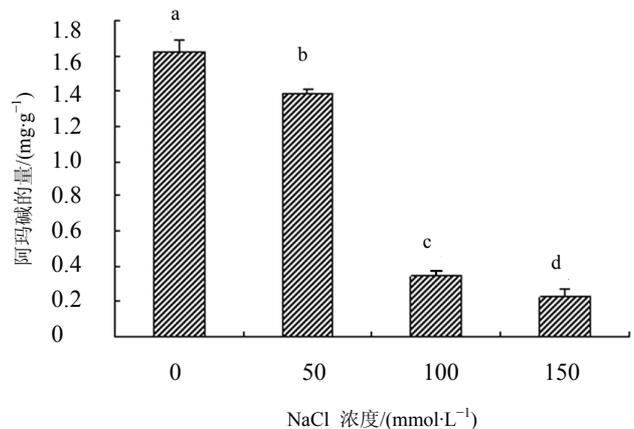


图 4 NaCl 胁迫对长春花愈伤组织阿玛碱量的影响

Fig. 4 Effect of NaCl stress on ajmalicine of *C. roseus* calli

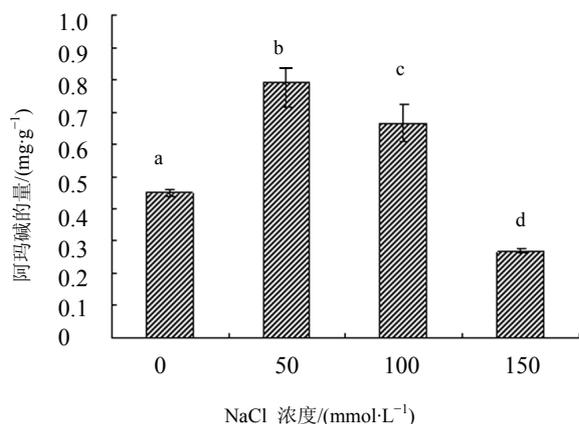


图 5 NaCl 喷洒处理对长春花愈伤组织阿玛碱量的影响
Fig. 5 Effect of NaCl spray on ajmalicine of *C. roseus* calli

3 讨论

本实验用不同浓度的 NaCl 溶液处理长春花愈伤组织,随着 NaCl 浓度的增高,愈伤组织的生物量受到明显的抑制,细胞膜的损伤逐渐升高。用适当浓度的 NaCl 处理愈伤组织后,阿玛碱的量也有所提高。因此,长春花的次生代谢与环境胁迫有着密切的关系。长春花在抵御环境胁迫时,次生代谢参与抗逆过程的机制还不很清楚。随着长春花细胞培养工业化生产的发展,阿玛碱的经济价值日益提升,研究影响长春花细胞阿玛碱代谢的胁迫条件具有重大的意义,这将对长春花细胞培养的大规模生产起到一定的指导作用。

参考文献

[1] 黄璐琳,胡尚钦,杨晓.药用植物生物工程研究进展 I.

组织和细胞培养研究 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 486-491.

- [2] 陈巍,高文远,贾伟.人参属药用植物组织和细胞培养的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(4):616-620.
- [3] Verpoorte R, Heijden R, Schripsema J, *et al*. Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospect [J]. *J Nat Prod*, 1990, 56: 186.
- [4] 韩健,戴均贵,崔亚君,等.长春花及银杏植物细胞悬浮培养对青蒿素的生物转化研究 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 166-168.
- [5] 段传人,王伯初,徐世荣.环境应力对植物次生代谢产物形成的作用 [J]. 重庆大学学报, 2003, 26 (10) : 67-71.
- [6] 王景艳,刘兆普,刘玲,等.盐胁迫对长春花幼苗生长和生物碱含量的影响 [J]. 应用生态学报, 2008, 19 (10) : 2143-2148.
- [7] Zhao J, Hua W Z, Hu Q, *et al*. Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 1227-1231.
- [8] 李合生,孙群,赵世杰,等.植物生理化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [9] 王宁宁,王淑芳,田俊英,等.土壤农杆菌转化的长春花冠瘿细胞培养 [J]. 生物工程学报, 1994, 10 (3): 244.
- [10] Kimura Y, Watanabe T, Kimura M, *et al*. Salt adaptation of tobacco BY2 cells Induces change in glycoform of N-glycans: enhancement of exo-and endo-glycosidase activities by salt adaptation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(2): 514-522.
- [11] 苏虎,周春丽.不同逆境胁迫条件对草珊瑚总黄酮含量的影响 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7995-7996.