维普资讯 http://www.cqvip.com

第29卷第2期
2006年3月

河北农业大学学报
JOURNAL OF AGRICULTURAL UNIVERSITY OF HEBEI

Vol.29 No.2
Mar. 2006

文章编号：1000-1573(2006)02-0026-04

鞘氨醇和水分胁迫对紫花苜蓿愈伤组织培养的影响

郑晓洁， 蒋继志， 廖祥儒， 杨 磊， 苑博华
（河北大学 生命科学学院，河北 保定 071002）

摘要：研究了低于0.1 mg/L的不同浓度鞘氨醇处理对苜蓿子叶愈伤组织诱导及在干旱胁迫中的影响。结果表明，在15 d内该浓度范围的鞘氨醇明显抑制苜蓿愈伤组织形成，但30 d时，经鞘氨醇处理的愈伤组织诱导率与对照的无明显差异。继代培养时，供试不同浓度的鞘氨醇均明显降低细胞抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化物酶(POD)活性，但0.06 mg/L的鞘氨醇处理显著提高了POD的活性，在处理后15 d POD活性比对照增加了约2倍；不同浓度的鞘氨醇均使过氧化氢酶(CAT)活性大幅度升高，0.02 mg/L处理后15 d CAT活性增加了约8倍。在不同浓度聚乙二醇(PEG)胁迫下，鞘氨醇处理后紫花苜蓿愈伤组织中的过氧化物酶活性有所升高。

关 键 词：鞘氨醇；水分胁迫；紫花苜蓿；愈伤组织；酶活性
中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A

Effect of sphingosine and the water stress on callus culture of *Medicago sativa* L.

ZHENG Xiao-jie, JIANG Ji-zhi, LIAO Xiang-ru, YANG Lei, YUAN Bo-hua
(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Effects of the different concentrations of sphingosine below 0.1 mg/L on the induction of the callus and the drought stress of *Medicago sativa* L. were investigated. The experiment results showed that this range of concentration of sphingosine have no effect on the induction of the callus, and in 15 d the induction rates of the treated callus are lower than that of the check. control but in 30 d, there are not wide gaps between the induction rates of the treated callus with sphingosine and that of the check. Control group during the subculturing, sphingosine reduced the activity of POD and APX, but the treatment of 0.06 mg/L sphingosine promoted the activity of POD after 15 days, the activity increased by about 200%; and different concentrations of sphingosine promoted the activity of CAT by a big margin. The treatment of 0.02 mg/L sphingosine, after 15 days, the activity of CAT increased by about 800%. We treated callus of alfalfa with spingosine, and water-stressed using polyethylene glycol(PEG) as the stress reagent, the result showed that the activity of peroxides were higher than the untreated.

Key words: sphingosine; water stress; *Medicago sativa* L.; callus; enzyme activity

脂类物质长期以来一直被人们认为只是细胞膜上的一种惰性物质，但愈来愈多的研究报道指出脂类在细胞信号传导中具有重要作用。近年来，又有一种新的脂类——鞘脂类被证明具有多种生理活性

收稿日期：2005-12-02
基金项目：河北省自然科学基金项目(300081)，河北省省级重点学科生物工程
作者简介：郑晓洁(1981-)，女，河北张家口人，在读硕士生，研究方向为植物生物化学. E-mail: xiaojiebb@eyou.com.
通讯作者：蒋继志(1960-)，男，宁夏中宁人，博士生导师. E-mail: jiangjizhi@yahoo.com.

维普资讯 http://www.cqvip.com

作用,并引起了广泛关注。国外已有研究表明,作为鞘脂家族基石的鞘氨醇本身就充当着细胞中的信息物质。既可作为一种丝裂原,促进细胞的增殖[1],又可介导细胞生长停止[2],同时对细胞的迁移、凋亡具有调节作用[3]。一般认为,低浓度的鞘氨醇刺激动物细胞生长,但高浓度有毒。鞘脂类也参与调节植物对环境胁迫的适应,如在植物对干旱胁迫、冷胁迫的反应中具有一定作用[4]。此外,鞘脂类还参与植物与病原体之间的相互作用,如真菌脑苷脂能够介导植物的过敏性反应、使植物抗毒素累积、并与大多数鞘脂类化合物一样,还可诱导植物的自身防御反应、增强抗病性等[5]。但国内在这方面的研究未见报道,本研究就鞘氨醇对苜蓿子叶愈伤组织诱导及其在干旱胁迫中的作用进行初步探讨,为利用鞘脂类物质通过组织培养培育新的苜蓿抗性品种、以及深入了解鞘脂类物质在植物信号传导中的分子机制提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料

以山东莱阳农学院提供的紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种金皇后种子为试验材料。

1.2　方法

1.2.1　愈伤组织的诱导　挑选籽粒饱满的紫花苜蓿种子,用0.1%的升汞溶液消毒10 min,无菌水冲洗3~4次,无菌种子植入MS基本培养基中(10 g琼脂,pH=5.8),于(26±2)℃的条件下培养,每日用漫射光照射12 h,培养1周后即可得到无菌幼苗。将无菌幼苗的子叶切割成0.5 cm见方的切块,接种于附加不同浓度鞘氨醇的改良MS固体培养基(MS+2 mg/L 2,4-D+30 g/L蔗糖+10 g/L琼脂,pH=5.8)中(培养条件同前),培养20 d左右即可得到愈伤组织。

1.2.2　愈伤组织的继代培养及酶活性测定　将诱导期不经鞘氨醇处理而形成的愈伤组织嫩绿、松脆部分切成1 mm^3左右的小块分别转移到附加不同浓度的鞘氨醇(0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/L)MS培养基中进行继代培养,以不加鞘氨醇的处理为对照。一般以15 d为一个继代周期,每3 d进行一次测定。

过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法[6];过氧化氢酶(CAT)活性测定按李柏林和梅慧生的方法[7];抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定按照ASADA[8]和徐朗莱等[9]的方法。

实验先后重复3次,每次各有3次重复,取平均值统计分析。

1.2.3　鞘氨醇和PEG预处理愈伤组织　选取继代两次的愈伤组织,切成4 cm见方的小块,用含聚乙二醇(PEG-6000)和鞘氨醇的MS培养基进行渗透胁迫处理,PEG浓度分别为30 mg/L和18 mg/L,鞘氨醇浓度分别为0.06 mg/L和0.1 mg/L,对照MS培养基,重复3次。处理72 h后进行POD活性的测定。

2　结果与分析

2.1　鞘氨醇对紫花苜蓿愈伤组织诱导的影响

苜蓿子叶外植体培养4 d后,在附加不同浓度鞘氨醇的MS1、MS2、MS3、MS4、MS5、MS6 6种诱导培养基上均可观察到少数愈伤组织开始形成。随着进一步培养,愈伤组织不断增大,且成半透明团块,比较松软。分别在培养15 d和30 d时统计愈伤组织诱导率。由表1可看出,诱导15 d,鞘氨醇对苜蓿子叶愈伤组织的诱导具有一定的抑制作用,但并不呈浓度依赖关系,以0.06 mg/L鞘氨醇处理的效果稍明显;诱导30 d后,经鞘氨醇处理的愈伤组织诱导率基本处于相同水平,且与对照无较大差异。

表1　鞘氨醇对紫花苜蓿愈伤组织诱导的影响

Table 1　Effect of sphingosine on callus induction of *Medicago sativa* L.

培养基代号 No. of medium	鞘氨醇浓度/($mg \cdot L^{-1}$) Concentration of sphingosine	接种子叶数 No. of cotyledon	愈伤组织数/块 No. of callus		愈伤组织诱导率/% Inductivity of callus		差异显著性 Significance of difference	
			15 d	30 d	15 d	30 d	a=0.05	a=0.01
MS1	0	110	90	92	81.8	83.6	a	A
MS2	0.02	76	40	62	52.6	81.6	b	A
MS3	0.04	60	32	49	53.3	81.7	b	A
MS4	0.06	70	36	57	51.4	81.4	b	A
MS5	0.08	75	41	61	54.7	81.3	b	A
MS6	0.1	72	40	59	55.6	81.9	b	A

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 愈伤组织继代培养过程中酶活性的测定

从图1可以看出，POD活性，1～2 d对照组的活性和其它4种浓度的酶活性基本相同，且基本稳定；2 d后只有0.06 mg/L浓度处理的活性明显高于对照组（$P<0.05$），而且呈明显上升趋势，其他处理的都开始下降而且要比对照组的酶活性低。但0.02 mg/L浓度处理的活性和对照组的变化趋势相同，有缓慢下降的趋势；0.04 mg/L浓度和0.1 mg/L浓度的活性3 d后基本趋于稳定。

CAT活性，1～3 d时对照组和其它4种浓度的酶活性基本相同，之后对照组的活性开始呈现缓慢下降的趋势，且比其他浓度的活性要低，0.02 mg/L、0.06 mg/L和0.1 mg/L浓度的活性开始呈现明显上升趋势，而0.04 mg/L浓度的活性先上升后趋于稳定。

APX活性，1～3 d时对照组的酶活性明显要高于其他浓度的活性（$P<0.05$），之后对照组呈现明显下降趋势，4 d时仍略高于其他组，5 d达到最低，且比其他组的活性要低；0.02 mg/L、0.04 mg/L和0.1 mg/L浓度的活性在1～3 d时呈缓慢下降趋势，3 d时达到最低，后又开始上升；0.06 mg/L浓度的活性在1～3 d呈现缓慢上升趋势，3 d时达到最高，后又开始下降。

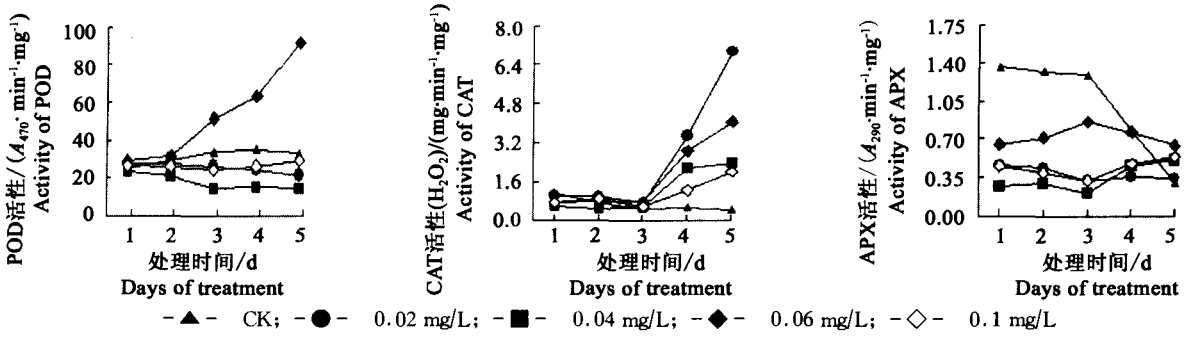

图1 苜蓿子叶愈伤组织继代培养过程中POD、CAT、APX活性变化

Fig.1 Changes in activity of POD、CAT、APX of *Medicago sativa* L. cotyledon callus during the subculturing

2.3 鞘氨醇和PEG对紫花苜蓿愈伤组织POD活性的影响

由表2可见，以PEG作为渗透胁迫剂时，POD活性随PEG浓度增加逐渐升高。在外源鞘氨醇（0.06 mg/L和0.1 mg/L）和PEG共同处理的72 h，苜蓿愈伤组织POD活性均较相应的对照组有所增强。认为胁迫72 h，PEG和鞘氨醇对苜蓿愈伤组织中的过氧化物酶有一定的激活效应。

表2 鞘氨醇和PEG处理对苜蓿愈伤组织POD活性的影响

Table 2 Effect of sphingosine and PEG on the activity of POD in *Medicago sativa* L. callus

处理 Treatments	POD活性/（U·mg^{-1}蛋白） Activity of POD
CK	0.43±0.08
PEG 18 mg/L	0.46±0.10
PEG 30 mg/L	0.51±0.13
SPH 0.06 mg/L+PEG 18 mg/L	0.52±0.11
SPH 0.1 mg/L+PEG 18 mg/L	0.73±0.15
SPH 0.06 mg/L+PEG 30 mg/L	0.62±0.15
SPH 0.1 mg/L+PEG 30 mg/L	0.85±0.07

注：1U=0.001 OD/min的酶量.

3 讨论

本研究结果表明，低于0.1 mg/L浓度的鞘氨醇在一定程度上不会影响苜蓿愈伤组织的生长。鞘氨醇是蛋白激酶C（PKC）的有效抑制物。现已有研究证实植物中确实含有PKC，但有关植物PKC在植物生长发育中的作用还有待于进一步探讨[10]。鞘氨醇可以刺激人胰腺癌细胞株JF305的增殖，且呈浓度依赖性（0.5～2 μmol/L）[11]。本试验在没有大于0.1 mg/L的浓度处理下研究，所以鞘氨醇在植物体中的作用范围是否与在动物体中的作用相同，这还有待进一步的研究探讨。

水分胁迫下抗氧化酶活性高低在一定程度上反映了植物抵抗干旱的能力强弱。POD也是干旱胁迫下植物体内的一种抗氧化酶，干旱胁迫下常依靠其活性的增强来清除或分解植物体内自由基和H_2O_2，防止和减少脂质过氧化的发生，对植物起到保护作用。由POD活性的大小判断植物抗旱性强弱，认为POD活性愈强，植物愈抗旱。

本研究材料是在加入PEG渗透胁迫时同时添加了一定浓度的鞘氨醇处理，在干旱胁迫时可能会导致部分酶的活性发生变化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究在胁迫72 h时,加入鞘氨醇的处理中POD活性均较其他处理组及对照组的活性要高,可能随着干旱胁迫进程的发生,POD活性变化复杂,但结果显示,胁迫72 h鞘氨醇在一定程度上进一步增强了POD这种保护酶的活性。同时,经鞘氨醇处理的苜蓿愈伤组织在生活力、长势等方面也显示比对照的好。推测鞘氨醇作为一种信号分子在愈伤组织诱导阶段可能激发了某种防御机制,或是增强了苜蓿在渗透胁迫下对O_2^-的消除能力,但在以PEG作为渗透胁迫剂时,是鞘氨醇与其相互作用共同使酶活性发生变化,还是鞘氨醇单独来完成这种保护作用的机理尚待进一步深入研究。

参考文献:

[1] MERRILL A H J R, SCHMELZ E M, DILLEHAY D L, *et al*. Sphingolipids - the enigmatic class lipid: biochemistry, physiology, and pathophysiology [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 142(1): 208 - 251.

[2] DBAIBO G S, WOLFF R A, OBEID L M, *et al*. Activation of a retinoblast oma protein dependent pathway by sphingosine[J]. Biochem J, 1995, 310(2): 453 - 459.

[3] JARVIS W D, FORNARI F A J R, AUER K L, *et al*. Coordinate regulation of stress and mitogen activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine [J]. Mol Pharmacol, 1997, 52(6): 9352 - 9471.

[4] PETRA SPERIING, EMST HEINZ. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 11 - 12.

[5] 谢芬,郭顺星.真菌来源鞘脂的结构及其活性研究进展[J].中国药学杂志,2002,37(7):481 - 484.

[6] 张志良.植物生理实验指导[M].北京:高等教育出版社,1999.154 - 155.

[7] 李柏林,梅慧生.燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系[J].植物生理学报,1989,10(15):6 - 9.

[8] ASADAK. Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging[J]. Methods Enzymol, 1984, 105: 422 - 429.

[9] 徐朗莱,叶茂炳.过氧化物酶活力连续记录测定法[J].南京农业大学学报,1989,12:82 - 83.

[10] 陈星,肖尊安,张崇浩.植物蛋白激酶C初探[J].植物生理学报,1996,22(4):437 - 440.

[11] 赵敏,王钢,姜若兰.鞘氨醇调节人胰腺癌细胞株JF305生长和钙代谢[J].肿瘤研究与临床,2001,13(4):152 - 154.

(编辑:李 川)

(上接第21页)

参考文献:

[1] 曲泽洲,王永惠主编. 中国果树志·枣卷[M].北京:中国林业出版社, 1993.

[2] 金芳.枣试管苗适宜生根培养基的选择研究[J].甘肃农业科技, 1996(4):20.

[3] 陈江.鸣山大枣离体培养的研究[J].甘肃林业科技, 1992(2):8 - 11.

[4] 罗晓芳,田砚亭,李云,等.金丝小枣组织培养快速繁殖的研究[J].北京林业大学学报, 1996,18(2):9 - 15.

[5] 金芳.NG在临泽小枣试管苗继代繁殖中的应用研究[J].甘肃农业科技, 1996(4):21 - 22.

[6] 陈宗礼,延志莲,薛皓,等.沾化冬枣叶片培养和植株再生[J].植物生理学通讯, 2002,38(6):584.

[7] 何振艳,王玉国,石武良,等.山西特有品种梨枣叶片的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯, 2002,38(5):457.

[8] 程佑发,安黎哲,浦铜良,等.枣愈伤组织诱导和再生植株[J].西北植物学报, 2000,20(3):364 - 369.

[9] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社, 1986:435 - 436.

[10] ETUENNE H, BERGER A, CARRON M P. Water stress of callus from heave brasiliensis during induction of somatic embryogenesis [J]. Physiologia Plantrum, 1991(82):213 - 218.

[11] 韩新柱,王素心,张世荃,等.枣树组织培养获得再生植株[J].林业科技通讯, 1998(10):28 - 29.

[12] 袁小环,彭向永,李青,等.甜樱桃组培苗的生根研究[J].西北农林科技大学学报, 2004,32(4):71 - 74.

(编辑:郭桂仙)