

LED 不同光质对萝卜愈伤组织诱导、增殖和萝卜硫素含量的影响

刘浩¹, 李胜^{1,2,*}, 马绍英^{1,2}, 罗丽媛¹, 薛冲¹, 方艳¹, 张真¹, 刘媛¹

¹甘肃农业大学生命科学技术学院植物细胞工程研究室, 兰州 730070; ²兰州汇通生物科技有限公司, 兰州 730000

摘要:以白水萝卜无菌苗及其愈伤组织为实验材料, 研究其在LED白、红、黄、蓝、绿和蓝红6种光质下的愈伤诱导和增殖。结果表明: LED不同光质下胚轴愈伤组织的诱导效应不同, 诱导率顺序依次为黄光>红光>蓝红光>白光>蓝光>绿光; 蓝光、黄光和红光有利于子叶愈伤组织的诱导; 子叶诱导愈伤组织的效果较下胚轴好; LED红光下愈伤组织的增殖倍数和萝卜硫素含量均为最高。

关键词: LED; 光质; 萝卜; 愈伤组织; 诱导; 增殖; 萝卜硫素

Effects of Different LED Light Qualities on Callus Induction, Proliferation and Sulforaphane Content of *Raphanus sativus* L.

LIU Hao¹, LI Sheng^{1,2,*}, MA Shao-Ying^{1,2}, LUO Li-Yuan¹, XUE Chong¹, FANG Yan¹, ZHANG Zhen¹, LIU Yuan¹

¹Laboratory of Plant Cell Engineering, College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730000, China; ²Lanzhou Huitong Biological Science & Technology Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: The callus induction and proliferation times of white radish (*Raphanus sativus*) under 6 kinds of LED light qualities (red, yellow, green, blue, white and blue+red) were investigated in this experiment. Results showed that different LED light qualities had different effects on callus induction of hypocotyls, with the efficiency in order of yellow>red>blue+red >white>blue>green, and the blue light, the yellow light and the blue+red light were all in favor of the callus induction of cotyledons, that more callus was induced from cotyledons than from hypocotyls, and that LED red light was the most effective light quality for callus proliferation and sulforaphane accumulation.

Key words: LED; light qualities; *Raphanus sativus*; callus; induction; proliferation; sulforaphane

萝卜硫素(sulforaphane, SUL)又称莱菔子素, 是存在于很多种十字花科蔬菜里的一种生物活性化合物, 能使细胞形成对抗外来致癌物侵蚀的膜, 启动人体内的防御功能, 具有防癌、抗癌作用(Zhang等1992)。近年来, 利用细胞和组织培养方法生产植物次生物质已成为生物制药的主流, 萝卜为常见的蔬菜, 从中提取萝卜硫素具有成本低、来源广等优点。关于萝卜的组织培养国内外均有报道, 影响萝卜离体培养的因素不仅有外植体的类型、培养基、生长调节物质、温度、湿度等因子, 光对萝卜的愈伤组织诱导也起重要的调节作用(王绍辉等2008), 武建等(2003)、龙雯虹等(2006a, b)从培养基组分和外植体的来源等方面对萝卜组织培养技术进行了研究。LED作为一种高效节能的新型光源在菊花(Kurilcik等2008)和朵丽蝶兰(Shin等2008)等植物的组织培养研究中已有报道, 但在萝卜组织培养研究中鲜见报道。本文利用LED不同光质对

白水萝卜无菌苗不同部位(子叶和下胚轴)及其诱导的愈伤组织进行处理, 研究其对愈伤组织诱导、增殖以及萝卜硫素的作用, 为从萝卜中提取萝卜硫素及LED光在组织培养中的应用提供参考。

材料与方法

实验材料为白水萝卜(*Raphanus sativus* L.)种子(甘肃绿星农业科技有限责任公司提供)萌发所得无菌苗的子叶、下胚轴及其诱导的愈伤组织。

白水萝卜种子用流水冲洗1 h, 于超净工作台用1% 84消毒液消毒1 min, 0.1% HgCl₂消毒10 min, 最后用无菌水洗涤6~7次, 接种于不含生长调节剂的MS培养基上, 每瓶8粒种子, 置于(25±1) °C和12 h·d⁻¹光周期下培养, 发芽后获得无菌苗。

收稿 2010-01-01 修定 2010-02-22
资助 教育部新教师基金(20096202120008)。
* 通讯作者(E-mail: lish@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7631547)。

取7天苗龄的无菌苗, 切取下胚轴(约5 mm)和子叶(约5 mm×5 mm)接种到诱导培养基(MS+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D +2 mg·L⁻¹ 6-BA)上。分别置于LED白光(424~724 nm, 459 nm)、LED红光(606~657 nm, 635 nm)、LED黄光(567~606 nm, 588 nm)、LED蓝光(440~500 nm, 465 nm)、LED绿光(488~562 nm, 517 nm)和LED蓝红光(440~500 nm, 606~657 nm, 465 nm, 635 nm) 6种光质、培养温度(25±1) °C下培养30 d, 每个部位、每种光质下10瓶, 每瓶4块外植体。外植体接种2 d后开始观察其形态变化, 记录愈伤组织出愈时间和出愈数, 30 d后计算愈伤组织诱导率。

筛选质地疏松、生长旺盛的愈伤组织接种到增殖培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+3 mg·L⁻¹ 6-BA)上。置于上述LED不同光质条件下, 培养温度(25±1) °C。每个处理10瓶, 30 d后收获。观察愈伤组织的生长状况, 统计愈伤组织数量。以上培养基均附加3%蔗糖和0.5%琼脂, pH 5.8, 高压0.105~0.15 MPa、温度121 °C灭菌20 min。

取室温下风干至恒重的愈伤组织研磨至粉末状, 精确称取1.0 g至150 mL三角瓶中, 按1:2比例加水酶解过夜(12 h), 再用二氯甲烷浸提2次, 料液比1:20, 每次4 h, 过滤合并滤液倒入圆底烧瓶, 置于45 °C恒温水浴锅, 旋转蒸发器旋转浓缩, 浓缩液最终用甲醇定容至4 mL。取待测样品1 mL, 通过0.22 μm水系滤膜于离心管中待用。

色谱柱: C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 10 μm); 流动相: 乙腈:水=70:30; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 245 nm; 进样量: 20 μL; 检测灵敏度: 0.02

AUFS。

用移液枪准确移取5 mL甲醇(色谱纯)于5 mg的萝卜硫素标准品中, 配制成浓度为1.0 mg·mL⁻¹的标准溶液, 逐级稀释成浓度分别为500、250、125、62.5 μg·mL⁻¹的标准溶液。浓度由低至高依次进样, 分别进样3次, 每次20 μL, 在上述色谱条件下分析, 以萝卜硫素测定的峰面积(Y)为纵坐标, 萝卜硫素浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标(X)进行线性回归, 得到回归方程 $Y=7.0507X+210.15$, $R^2=0.9948$ 。

所有数据均采用SPSS 13.0 for Windows软件进行分析。

实验结果

1 LED不同光质对萝卜下胚轴愈伤组织诱导的影响

由表1可见, LED不同光质对萝卜下胚轴愈伤组织诱导影响显著($P<0.05$)。下胚轴在接种后第4天开始两端膨大, 1周后整体膨大, 10 d后黄光和白光下的下胚轴出现少量的颗粒状愈伤组织, 12 d后红光、蓝光、绿光和蓝红光下的下胚轴也有少量的愈伤组织产生, 15 d后愈伤组织开始大量出现。诱导效果从高到低依次为黄光>红光>蓝红光>白光>蓝光>绿光。

2 LED不同光质对萝卜子叶愈伤组织诱导的影响

LED不同光质对萝卜子叶愈伤组织的诱导影响如表2。子叶在接种后第2天就有少部分启动, 3~5 d时子叶边缘开始卷翘膨大, 第10天时白光和黄光下的子叶边缘伤口处出现愈伤组织, 红光、蓝光、绿光和蓝红光下的子叶在2 d后也有少量的愈伤组织出现, 15 d后60%的子叶产生愈伤。

表1 LED不同光质对萝卜下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effect of different LED light qualities on callus induction of radish hypocotyls

LED 光质	出愈时间/d	出愈率/%	长势	愈伤组织形态	标准差
白光	10	35.00	+++	深绿, 瘤状	c
红光	12	50.00	+++++	浅绿, 颗粒状	a, b
黄光	10	80.00	++++	黄绿, 颗粒状	a
蓝光	12	31.25	++	淡绿, 细小颗粒状	c, d
绿光	12	6.25	+	淡绿, 细小颗粒状	d
蓝红光	12	45.00	+++	浅绿, 细小颗粒状	b

表中“+”表示在萝卜愈伤组织诱导过程中的长势情况。+++++表示5级, 长势最好; ++++表示4级; +++表示3级; ++表示2级; +表示1级, 长势最差。表2同此。小写字母均表示差异显著性($P<0.05$), 表2、图1~4同此。

表2 LED不同光质对萝卜子叶愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effect of different LED light qualities on callus induction of radish cotyledons

LED 光质	出愈时间/d	出愈率/%	长势	愈伤组织形态	标准差
白光	10	50.00	+++	深绿, 瘤状	e
红光	11	78.60	++++	浅绿, 颗粒状, 水分较少	b
黄光	10	75.00	++++	黄绿, 颗粒状, 表面湿润	c
蓝光	11	85.00	++++	淡绿, 细小颗粒状	a
绿光	11	53.60	++	淡绿, 细小颗粒状	d
蓝红光	11	41.70	+++	浅绿, 细小颗粒状	f

3 LED不同光质对萝卜愈伤组织增殖的影响

LED不同光质处理愈伤组织的生长积累差异显著($P<0.05$)。接种后的1~10 d愈伤组织的外表无明显变化, 增重较平稳, 细胞处于适应阶段。接种10 d后, 愈伤组织急剧分裂, 鲜重剧增, 体积明显增大。15 d后愈伤组织分裂速度逐渐下降, 增重又趋于平稳。20~30 d, 蓝红光下部分愈伤组织出现褐化, 白光、红光和蓝光下愈伤组织也先后开始褐化, 生长趋于停滞状态。绿光和黄光照射下愈伤组织呈乳白色水浸状且结构紧密, 30 d内未出现褐化现象。红光下愈伤组织生长量(鲜重)最高, 增殖倍数达15.7, 愈伤组织呈淡绿色瘤状, 表面湿润, 是实验中效应最强的光质, 而黄光对愈伤组织生长效应则最低, 说明红光能促进萝卜愈伤组织的增殖(图1)。

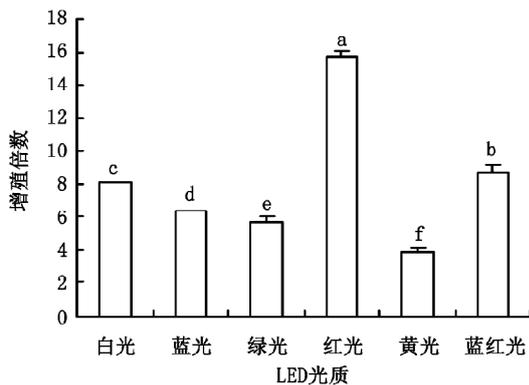


图1 LED不同光质对萝卜愈伤组织增殖的影响

Fig.1 The effect of different LED light qualities on callus proliferation of radish

4 LED不同光质对萝卜愈伤组织含水量的影响

LED不同光质对愈伤组织含水量的影响如图2所示。红光下萝卜愈伤组织的含水量最高达95%, 蓝红光(94.3%)次之, 白光下(93%)、蓝光下(93%)

和绿光下(91%)的含水量更低, 而黄光下萝卜愈伤组织的含水量最低仅为90%。

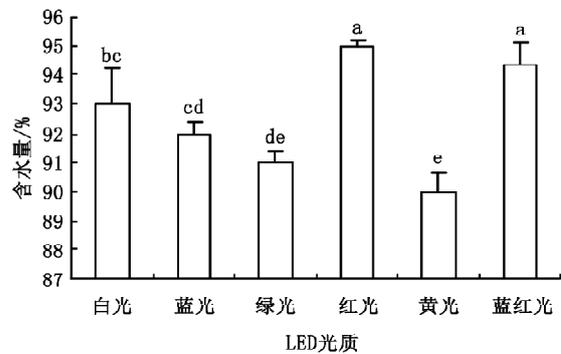


图2 LED不同光质对萝卜愈伤组织含水量的影响

Fig.2 The effect of different LED light qualities on callus water content of radish

5 LED不同光质对萝卜愈伤组织中萝卜硫素含量和产量的影响

由图3可见, 不同光质下生长的萝卜愈伤组织中萝卜硫素含量不同。红光条件下的愈伤组织中萝卜硫素的含量最高, 达 $3.17 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 蓝红光

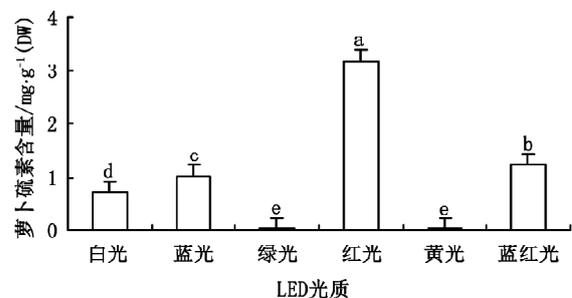


图3 LED不同光质对萝卜愈伤组织萝卜硫素含量的影响

Fig.3 The effect of different LED light qualities on sulforaphane content of radish

下[1.24 mg·g⁻¹(DW)]次之, 蓝光下[1.02 mg·g⁻¹(DW)]和白光下[0.71 mg·g⁻¹(DW)]的含量更低, 而绿光下和黄光下的含量仅为红光的0.8%和0.65%, 表明绿光和黄光不利于萝卜硫素的合成。

在几种不同光质中, 红光下萝卜硫素的产量明显高于其他光质, 为 1.94 mg·瓶⁻¹, 说明红光能显著促进萝卜硫素的积累; 其次是蓝红光(0.54 mg·瓶⁻¹)和蓝光(0.50 mg·瓶⁻¹); 而绿光和黄光下的产量仅为红光下的 0.65% 和 0.52% (图 4)。

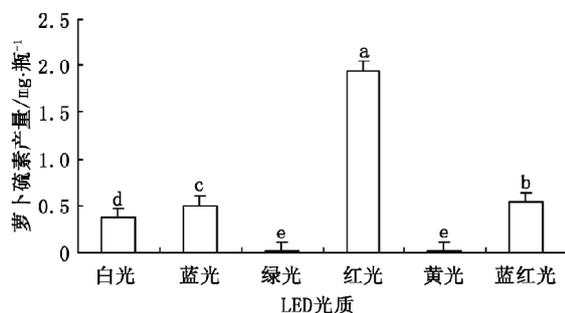


图4 LED不同光质对萝卜愈伤组织萝卜硫素产量的影响
Fig.4 The effect of different LED light qualities on sulforaphane production of radish

讨 论

不同波长光作为一种物理因子已广泛应用于植物组织培养过程中的形态发生、生长控制、光形态建成及其各种反应机制的研究。不同光质对植物愈伤组织、器官及原生质体培养过程中的生长、分化、代谢与基因表达等也有一定程度的影响(崔堂兵等 2001)。本实验中, 2种萝卜外植体(子叶和下胚轴)在LED不同的光质下被诱导, 子叶的脱分化率均高于下胚轴, 这与龙雯虹等(2006a)的研究一致。LED不同光质处理中, LED黄光有利于下胚轴和子叶的脱分化, 而LED绿光对愈伤组织的诱导有一定的抑制作用, LED蓝红光对愈伤组织的诱导效应不及单色光。周吉源等(1992)发现采用一定强度的单色光处理, 可以缩短外植体的启动时间, 促进愈伤组织增殖。石岭等(1999)以河套蜜瓜幼苗的叶片、子叶、茎段、茎尖为培养材料, 在红光、蓝光、红蓝混合光和普通白光的光照条件下进行培养, 红蓝混合光对于子叶和叶片愈伤组织的形成明显不如单色光, 其形成率只有13.33%, 而且发育不良, 这与本文的研究结果一致。

阎秀峰等(2003)在研究光质对高山红景天生物量和红景天甙含量的影响中发现, 红光有利于红景天甙的合成。张真等(2008)在葡萄愈伤组织的培养中发现绿光下白藜芦醇产量最低。本实验中LED不同光质处理下, LED红光能明显提高萝卜细胞中萝卜硫素含量和产量, LED黄光和绿光最不利于萝卜硫素的合成。这一结果与上述研究结论一致, 但与赵德修等(1999)报道蓝光对水母雪莲愈伤组织中黄酮合成的促进作用最强, 而红光条件下黄酮含量最低的结果不同。

不同光质对愈伤组织生长及次生代谢产物合成的影响, 由于研究者使用的光源和外植体材料不同、培养基的组分各异, 研究的结果也不尽相同, 说明离体条件下, 光质调控植物光形态建成的复杂性, 有待于我们进一步的研究。

参考文献

- 崔堂兵, 郭勇, 林炜铁(2001). 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法. 植物生理学通讯, 37 (5): 479~482
- 龙雯虹, 许彬, 张丽萍, 张应华(2006a). 萝卜诱导愈伤组织的影响因素. 西南农业大学学报(自然科学版), 28 (1): 131~133
- 龙雯虹, 杨荣萍, 王建飞, 张应华(2006b). 萝卜诱导愈伤组织较适外植体及激素的筛选. 河南农业科学, (2): 93~95
- 石岭, 霍秀文, 郝春光(1999). 不同光质对河套蜜瓜器官培养的影响. 内蒙古农牧学院学报, 2 (20): 76~79
- 王绍辉, 高遐虹, 程继鸿, 杨瑞, 赵金芳, 邓伟(2008). 萝卜花药愈伤组织诱导及褐变因素初探. 中国农学通报, 11 (24): 350~354
- 武剑, 龚义勤, 邓波, 魏跃, 任同辉(2003). 萝卜离体再生的影响因素. 中国蔬菜, (6): 6~8
- 阎秀峰, 王洋, 尚辛亥(2003). 温室栽培光强和光质对高山红景天生物量和红景天甙含量的影响. 生态学报, 23 (5): 841~849
- 张真, 李胜, 李唯, 刘媛, 吴兵, 张青松, 李婷(2008). 不同光质光对葡萄愈伤组织增殖和白藜芦醇含量的影响. 植物生理学通讯, 44 (1): 106~108
- 赵德修, 李茂寅, 邢建民, 童哲(1999). 光质、光强和光期对水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响. 植物生理学报, 25 (2): 127~132
- 周吉源, 赵洁, 杨和平, 程井展(1992). 油菜薄层细胞培养中不同光质对愈伤组织诱导和增殖的效应. 华中师范大学学报(自然科学版), 26 (1): 77~81
- Kurilcik A, Miklusyte-Canova R, Dapkuniene S, Zilinskaite S, Kurilcik G, Tamulaitis G, Duchovskis P, Zukauskas A (2008). *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes. Cent Eur J Biol, 3 (2): 161~167
- Shin KS, Murthy HN, Heo JW, Hahn EJ, Paek KY (2008). The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. Acta Physiol Plant, 30: 339~343
- Zhang YS, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 2399~2403