

不同碳源对悬浮培养玫瑰茄细胞主要基质消耗的影响

73-77

侯学文 郭勇

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

S641.1035

摘要 采用了蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉3种不同碳源, 考察了在摇瓶培养过程中, 这3种碳源对维持悬浮培养过程中玫瑰茄细胞的生长及主要基质消耗的影响。结果表明, 蔗糖和葡萄糖在这些方面的表现基本相同, 而可溶性淀粉由于植物细胞对其没有有效的水解利用手段, 因而不能支持植物细胞的生长, 从基质消耗水平上来看, 也明显慢于上述两类碳源。

关键词 碳源; 悬浮培养; 玫瑰茄; 基质消耗

The effect of various carbon sources on the assimilation of nutrients in Roselle suspension culture

Hou Xuwen Guo Yong

(Department of Biotechnology, South-China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract In order to study the effect of carbon sources on the growth of suspension Roselle cell and its nutrients assimilation, sucrose, glucose and soluble starch were used as carbon sources in flask culture of Roselle. The results were that sucrose and glucose were two good carbon sources which could support the growth of Roselle cell, but soluble starch could not be assimilated by Roselle cell, and other nutrients assimilation by Roselle cell were far slower than that of two above carbon sources.

Key words carbon source; suspension culture; Roselle; medium assimilation

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) 或称山茄, 为锦葵科木槿属草本植物, 原产于非洲, 于1910~1945年间引入我国, 现在南方省区有大面积栽培。本实验室多年前从玫瑰茄花萼中诱导出了两种细胞系: 一株呈红色, 产花青素; 另一株呈白色, 悬浮培养时细胞分散度高, 生长周期相对较短, 因而是理想的研究细胞生长状况的材料。

在植物细胞培养中, 最常用的碳源是蔗糖^[1], 但也有其它碳源的^[2]。本工作将研究在悬浮培养玫瑰茄细胞时, 以蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉为碳源, 通过连续监测细胞的生长及基质消耗情况, 来理解不同碳源下细胞的生长行为。

1998-03-13 收稿

第一作者简介: 侯学文, 男, 1969年出生, 博士, 生物学专业, 现在华南农业大学资源环境学院做博士后研究。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养条件

以本实验室多年培养的玫瑰茄白色细胞株为实验材料。先将固体培养基上的愈伤组织转入 1 000 mL 三角瓶 (400 mL 培养液) 制作悬浮培养种子瓶, 然后在液体培养基中传代 1~2 次, 使细胞分散度更佳, 以保证试验材料均匀一致。试验采用 100 mL 三角瓶, 装液量 50 mL, 培养液 pH 调至 5.8, 分装后经 121 ℃ 灭菌 15 min, 接种量为 1.5 g 鲜细胞/瓶。采用三种不同的配方: (A) B₅ 培养基加 3% 蔗糖; (B) B₅ 培养基加 3% 葡萄糖; (C) B₅ 培养基加 0.5% 可溶性淀粉, 植物激素均为 4.5 μmol/L 2,4-D 与 2.3 μmol/L Kt, 摇床转速 130 r/min, 培养周期为 16 d, 每 2 d 取样测定一次。

1.2 生物量的测定 取样后, 用布氏漏斗抽干, 在万分之一光电分析天平上称重, 此定为鲜重。

1.3 培养基中残糖的测定 蔗糖、果糖及可溶性总糖的测定均采用蒽酮法^[1]。

1.4 还原糖的测定 3, 5-二硝基水杨酸法^[2]。

1.5 培养液中 NO₃⁻ 的测定 按 Catald 等的方法^[3]。

1.6 培养液中 NH₄⁺ 的测定 按 Ursula Hecht 等的方法^[4]。

1.7 培养液中 PO₄³⁻ 的测定 抗坏血酸还原法^[5]。

2 实验结果与讨论

2.1 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的生长曲线

通过预试验表明, 3% 的蔗糖或葡萄糖均能有效支持悬浮培养玫瑰茄细胞的生长, 选择 0.5% 可溶性淀粉是因为受到淀粉溶解度的限制, 它不能支持玫瑰茄细胞的生长, 不是受到量少的限制, 而是因为植物细胞不能水解可溶性淀粉为单糖供其生长利用。从实验结果来看, 蔗糖与葡萄糖对支持玫瑰茄细胞的生长, 有效性基本等同。虽然蔗糖要先被植物细胞分泌的转化酶水解成等分子的葡萄糖与果糖, 然后才能被植物细胞吸收利用, 但这似乎并未阻碍植物细胞的生长速率, 反而其生物量还比单纯葡萄糖的培养基略高, 不知是实验的误差, 还是有更深一层的原因, 值得进一步探索。0.5% 可溶性淀粉明显不能支持植物细胞生长, 其最高生物量仅仅为接种量的 2 倍多一点, 远低于另外两种碳源的增长倍数 (12~13 倍)。

2.2 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的碳源消耗曲线

由于植物细胞没有吸收转运蔗糖的系统, 培养液中的蔗糖必须先经过转化酶的作用分解成葡萄糖和果糖, 因此在培养初期, 随着蔗糖浓度的下降, 可以观察到葡萄糖和果糖的浓度增加。葡萄糖是磷酸戊糖途径的直接碳源, 其吸收、利用速度相对较果糖为快, 实验过程的监测也证明了这一点。

在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中, 随着细胞的生长, 碳源逐渐被消耗, 可以发现, 在迟滞期及对数生长前期, 碳源的消耗相对较慢, 只在数生长中期, 随着细胞的突然大量增加, 碳源消耗也出

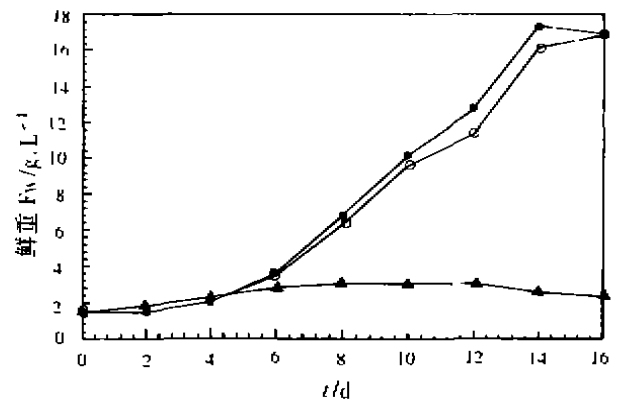


图 1 不同碳源下玫瑰茄细胞的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of suspension Rosell cell under different carbon sources

●—3% 蔗糖 ○—3% 葡萄糖 ▲—0.5% 可溶性淀粉
●—3% Sucrose ○—3% Glucose ▲—0.5% Soluble starch

现一个跃变, 从 14.26 g/L 消耗至 3.31 g/L.

在以 0.5% 可溶性淀粉为唯一碳源的培养基中, 在 0~2 d 均不能测到还原糖, 说明高压灭菌并不能造成可溶性淀粉的显著水解。在 4 d 以后, 在培养基中能检测到较低的还原糖水平, 因此也只能有限地支持玫瑰茄细胞的生长。在 16 d 时, 仍能测到较 A、B 配方高的总糖水平, 说明并非 0.5% 可溶性淀粉的量, 而是其不能被植物细胞有效地水解利用, 才限制了植物细胞的生长, 因此可溶性淀粉对植物细胞培养来说, 不是一个好的碳源。

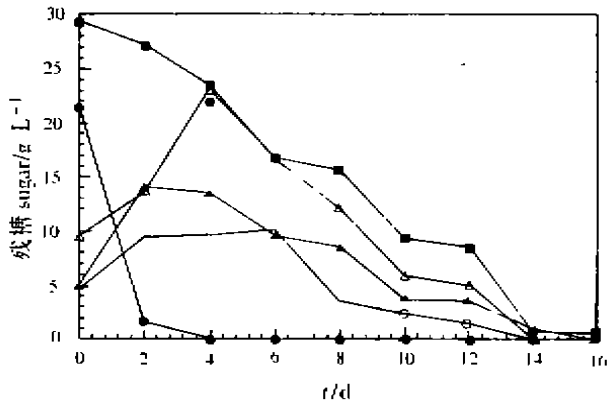


图2 以蔗糖为碳源时培养基中残糖的变化曲线

Fig. 2 The time course of sugar in culturing medium used sucrose as carbon source

●-蔗糖 ○-葡萄糖 ▲-果糖 △-还原糖 ■-总糖
●-Sucrose ○-Glucose ▲-Fructose △-Reduced sugar ■-Total sugar

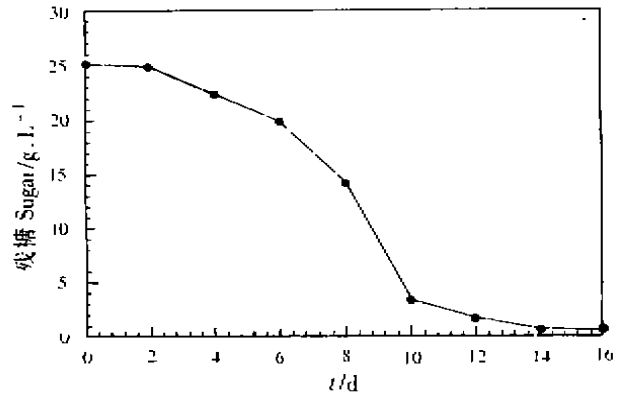


图3 以葡萄糖为碳源时培养基中残糖的变化曲线

Fig. 3 The time course of sugar in culturing medium used glucose as carbon source

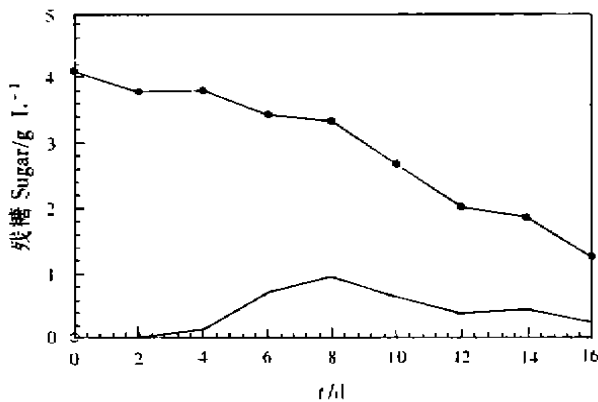


图4 以可溶性淀粉为碳源时培养基中残糖的变化曲线

Fig. 4 The time course of sugar in culturing medium used soluble starch as carbon source

●-总糖 ○-还原糖 ●-Total sugar ○-Reduced sugar

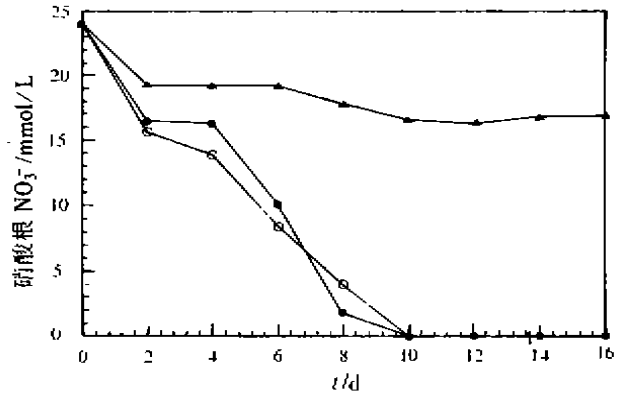


图5 不同碳源下培养基中硝态氮的消耗曲线

Fig. 5 The time course of nitrate nitrogen in culturing medium under different carbon sources

●-3%蔗糖 ○-3%葡萄糖 ▲-0.5%可溶性淀粉
●-3% Sucrose ○-3% Glucose ▲-0.5% Soluble starch

2.3 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞对硝态氮的同化

在 B₅ 培养基中, 氮源主要是从硝态氮 (NO₃⁻) 的形式提供, 是构成氨基酸及其它一些含氮化合

物的不可缺少的成分, 细胞的生长速度快, 其氮源消耗也快, 如 A、B 配方; 而以 0.5% 可溶性淀粉为碳源的 C 配方, 由于其不能有效地支持细胞生长, 其硝态氮消耗速度很慢, 到培养末期, 仅约消耗了供给氮源的 1/3。

2.4 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞对铵态氮的同化

在 B₅ 培养基中, 铵态氮只占总氮源中的极少部分, 且植物细胞具有快速利用铵态氮的机制, 因此, 在生长良好的培养基中, 细胞一开始启动生长, NH₄⁺ 即被消耗完毕。而在生长较为缓慢的 C 配方, 直至第 10 d 才将 NH₄⁺ 消耗完毕, 这也从一个侧面说明了 0.5% 可溶性淀粉不能支持植物细胞的生长。

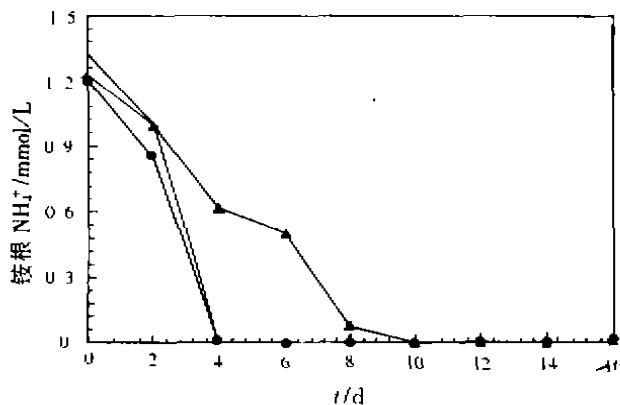


图6 不同碳源下培养基中铵态氮的消耗曲线
Fig. 6 The time course of ammonium nitrogen in culturing under different carbon sources

●—3%蔗糖 ○—3%葡萄糖 ▲—0.5%可溶性淀粉
●—3% Sucrose ○—3% Glucose ▲—0.5% Soluble starch

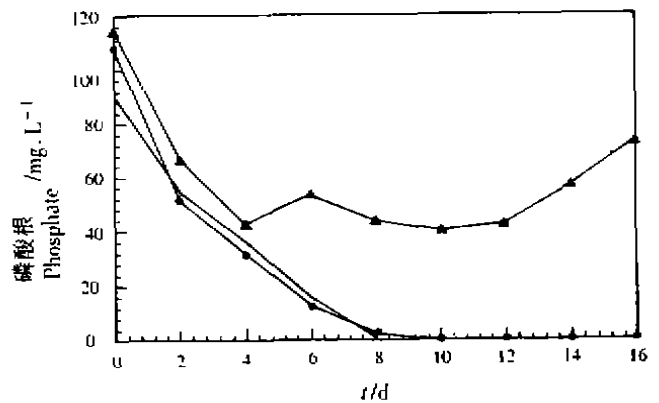


图7 不同碳源下培养基中磷酸根的消耗曲线
Fig. 7 The time course of phosphate in culturing medium under different carbon sources

●—3%蔗糖 ○—3%葡萄糖 ▲—0.5%可溶性淀粉
●—3% Sucrose ○—3% Glucose ▲—0.5% Soluble starch

2.5 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞对 H₂PO₄²⁻ 的同化曲线

磷酸根(无机磷)经植物细胞同化后, 转变为有机磷, 可构成核酸、蛋白质、糖类磷酸化等, 由此可见, 磷酸根是植物细胞的必需元素。在 3 种配方中, 都观察到在 0~2 d 过程中, 磷酸根都有较大降幅, 说明细胞有快速的磷吸收机制, 贮存在细胞内, 以供细胞生长、繁殖之用。而在 C 配方中, 在 0~8 d 之间, 随着细胞缓慢生长, H₂PO₄²⁻ 也逐渐减少, 但发现在 8~16 d 后, 随着细胞量的减少(可能因细胞死亡而裂解), 磷酸根却有逐渐回复上升的趋势, 这可能是伴随着细胞的衰亡、胞内磷酸根逐渐释放出来的结果。

3 结 论

从实验结果来看, 蔗糖和葡萄糖均能有效地支持悬浮培养玫瑰茄细胞的生长, 是优良的碳源, 但似乎蔗糖比葡萄糖略好, 然而二者的差别未达到显著水平。而在以可溶性淀粉为唯一碳源的培养基中, 因为植物细胞没有降解淀粉的机制, 故可溶性淀粉不能吸收利用, 实际上细胞处于碳源饥饿状态, 限制了细胞的生长, 同时也限制了其它营养物质的消耗吸收, 这从上述实验结果中可以明显看到这一点。

参 考 文 献

- 1 Cournac L, Dimon B, Carrier D *et al* Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated in vitro in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. *Plant physiol*, 1991, **112**: 111~117
- 2 Shafer C, Simper H, Hofmann B. Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautotrophic suspension cultured cells of *Chenopodium rubrum* *Plant Cell Environ.*, 1992, **15**: 343~358
- 3 薛应龙编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985
- 4 北京大学生化教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990. 5~7
- 5 Catakdo DA, Hanson M, Schrder L E *et al* Rapid Colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Sci. Plant Anal.*, 1975, **6**: 71~80
- 6 Vrsula Hecht Hans Mohr. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in murtard (*xinapis alba*) seedlings. *Physiol. Plantarum*, 1990, **78**: 379~387
- 7 Chen P S *et al*. *Anal. Chem.* 1956, **28**: 1756~1758