

文章编号: 1001-411X(2000)04-0051-04

接种量及蔗糖浓度对悬浮培养 玫瑰茄细胞生长的影响

侯学文¹, 郭 勇²

(1 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 华南理工大学生物工程系, 广东 广州 510641)

摘要:以悬浮培养玫瑰茄细胞为研究对象, 探讨了不同初始接种量以及蔗糖浓度对玫瑰茄细胞生长的影响. 结果表明随着接种量增大, 细胞生长启动加快, 但细胞比生长速率却逐渐降低, 这表明细胞的分裂启动存在着密度依赖现象, 而细胞的生长却存在密度抑制现象; 在 $\rho(\text{蔗糖})$ 为 20~50 g/L 范围内, 当 $\rho(\text{蔗糖})$ 为 40 g/L 时, 蔗糖是作为限制性基质而存在, 而当 $\rho(\text{蔗糖})$ 超过 40 g/L 时, 蔗糖就表现出基质抑制效应, 这明显体现在玫瑰茄细胞对残糖消耗、硝酸根等基质的消耗上.

关键词: 接种量; 蔗糖浓度; 悬浮培养; 玫瑰茄细胞

中图分类号: Q813.11

文献标识码: A

玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* Linn.)或称山茄, 为锦葵科木槿属一年生直立草本植物, 广泛分布于热带、亚热带地区. 侯学文等^[1]曾报道从其花萼中诱导出了 1 株白色细胞系, 该细胞系生长速度快, 1 个培养周期约 14 d, 悬浮培养时细胞没有结团现象, 细胞之间基本上达到单分散状态, 因而可以作为研究细胞对不同预设条件(如缺磷、缺氮及其他逆境)响应的理想材料. 悬浮培养细胞生长的启动需要有一个最低的起始密度. 植物细胞的这一临界密度不仅与植物细胞本身有关, 而且还与培养基成分以及接种量有关, 因此细胞的接种量能够显著影响悬浮培养细胞的生长周期; 蔗糖是植物细胞培养中最常用的碳源, 它不仅是能源物质, 而且还是细胞的构架物质, 因此对培养细胞的生长具有重要影响. 本文以玫瑰茄细胞为模式系统, 研究了接种量及蔗糖浓度对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响.

1 材料与方法

1.1 供试材料与培养条件

以华南理工大学生物工程系培养多年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(含 400 mL B₅ 培养基)制作种子瓶, 然后在相同的液体培养基中传代 1~2 次, 使细胞更适应液体培养环境, 以保证实验结果的

准确可靠. 试验采用 100 mL 的三角瓶, 装液量为 50 mL, 培养液 pH 值调至 5.8, 分装后经 121℃灭菌 15 min, 植物生长调节剂为 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 和 2.3 $\mu\text{mol/L}$ Kt. 进行接种量实验时, $\rho(\text{蔗糖})$ 均为 30 g/L, 玫瑰茄细胞接种量设计为 4、10、30、60、110 g/L; 进行蔗糖浓度实验时, 玫瑰茄细胞接种量为 30 g/L, $\rho(\text{蔗糖})$ 分别设计为 2、3、4、5 g/L. 摇床转速 130 r/min, 培养周期 14 d, 每 2 d 取样测定^[2].

1.2 生物量的测定

取样后用布氏漏斗抽滤, 在万分之一的光电分析天平上称鲜质量.

1.3 培养液中残糖的测定

蒽酮法^[3].

1.4 培养液中 NO_3^- 的测定

按 Cataldo 等^[4]的方法.

1.5 培养液中 NH_4^+ 的测定

按 Ursula Hecht 等^[5]的方法.

1.6 培养液中 PO_4^{3-} 的测定

抗坏血酸还原法^[6].

2 结果与分析

2.1 不同接种量对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响

细胞接种量对悬浮培养细胞而言是重要的生物影响因子, 对细胞的生长过程和生长参数有非常显著的影响, 见图 1 与表 1.

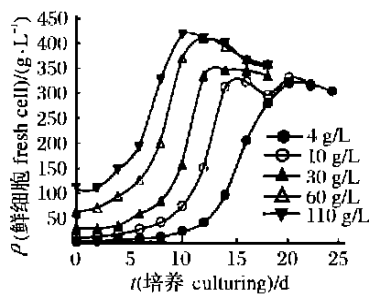


图 1 不同接种量对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响
Fig. 1 The effect of inoculum amount on the growth of suspension roselle cell

培养细胞在开始分裂增殖前需要一个最低的临界起始密度的原因尚未完全阐明, 可能的原因是细胞分裂的启动, 需要细胞内一种称为条件因子的物质达到一定的内源水平^[7], 在细胞密度较高时, 这种

条件因子发生少量泄漏即可与环境达到动态平衡, 胞内的条件因子很容易保持在分裂所需的临界水平上; 在培养基成分全面、丰富的情况下, 因条件因子较易合成而达到分裂所需的内源水平. 因此, 在高细胞接种密度和培养基成分全面、丰富的条件下, 因条件因子较易达到细胞分裂所需的内源水平, 使细胞生长启动迅速, 表现在细胞迟滞期缩短. 从表 1 可以看到, 随着接种量的增大(4~110 g/L), 迟滞期就相应缩短(从 6 d 减至 2 d). 可见, 细胞的分裂启动存在着密度依赖现象. 不同植物细胞之间的临界起始密度是大不相同的, 如黄花蒿的临界密度在 10~30 g/L 之间, 而悬浮培养玫瑰茄细胞的临界密度却在 4 g/L 以下. 从 2 种细胞的生长状况来看, 玫瑰茄细胞明显好于黄花蒿细胞, 因此可以说临界密度越低, 细胞的生活力就越高.

表 1 不同接种量下, 悬浮培养玫瑰茄细胞的生长参数

Tab. 1 The growth parameters of suspension roselle cell under different inoculum amount

接种量 inoculum biomass/(g·L ⁻¹)	迟滞期 lag phase/d	到达平衡期的时间 the time to balance phase/d	最大生物量 maximum biomass/(g·L ⁻¹)	生物量增殖倍数 biomass propagation times	细胞比生长速率 cell specific growth rate/d ⁻¹	生物量倍增时间 the time to get double biomass/d
4	6	20	313.86	80.06	0.3409	2.03
10	4	16	324.86	29.53	0.2903	2.39
30	4	14	341.10	10.93	0.2680	2.59
60	3	12	407.02	6.48	0.1916	3.62
110	2	10	415.76	3.82	0.1751	3.96

由表 1 可以看出, 随着接种量的增大, 最大生物量与倍增时间也随之相应增大, 而到达平衡期的时间、迟滞期、细胞增值倍数及细胞比生长速率却随接种量的增大而减小, 细胞比生长速率是反映细胞生长快慢的指标, 却随着接种量的增大而显著降低(从 0.3409 d⁻¹降至 0.1751 d⁻¹), 这就导致我们提出, 在细胞的对数生长期, 细胞的生长存在着密度抑制现象, 这可能是细胞争夺有限的营养和生存空间造成的.

2.2 蔗糖浓度对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响

由图 2 可以看出, 蔗糖对玫瑰茄细胞的生长随着浓度的不同而表现出较大的差异. 在 ρ(蔗糖)为 20~40 g/L 的范围内, 蔗糖是作为限制性基质而存在的, 因此在此浓度范围内, 玫瑰茄细胞的生长与蔗糖浓度呈正相关关系; 而在 ρ(蔗糖)40 g/L 以上, 蔗糖就对玫瑰茄细胞的生长表现出基质抑制效应.

根据图 2 的数据, 利用最小二乘法求得不同蔗糖浓度下, 玫瑰茄细胞的生长曲线方程及比生长速率如下:

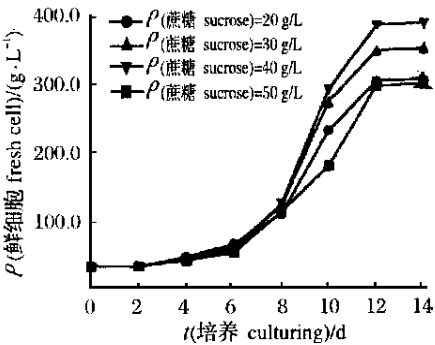


图 2 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞的生长曲线
Fig. 2 The growth curve of suspension roselle cell under different sucrose concentration

$\rho(\text{蔗糖})=20\text{ g/L: } \ln X=0.2507t+2.7715,$
 $\mu=0.2507\text{ d}^{-1}, r=0.9899;$
 $\rho(\text{蔗糖})=30\text{ g/L: } \ln X=0.2748t+2.6507,$
 $\mu=0.2748\text{ d}^{-1}, r=0.9856;$
 $\rho(\text{蔗糖})=40\text{ g/L: } \ln X=0.2994t+2.4609,$
 $\mu=0.2507\text{ d}^{-1}, r=0.9842;$
 $\rho(\text{蔗糖})=50\text{ g/L: } \ln X=0.2818t+2.3603,$
 $\mu=0.2818\text{ d}^{-1}, r=0.9932$

上述 X 代表生物量(g/L), t 表示时间(d), μ 为比生长速率(d^{-1}), r 为相关系数.

2.3 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞对培养液中残糖的消耗规律

培养液中的蔗糖是通过植物细胞壁上的转化酶, 在微酸性环境中被迅速分解为等分子的葡萄糖和果糖, 培养细胞优先吸收葡萄糖, 然后再利用果糖. 从图 3 的不同蔗糖质量浓度下残糖的消耗方式

均可看出这一点. ρ (蔗糖)为 20 g/L 不足以支持玫瑰茄细胞的生长, 表现在对数生长期时, 可利用的单糖浓度已经很低, 在培养结束前糖类已完全耗尽; ρ (蔗糖)为 $30、40\text{ g/L}$ 基本上能满足玫瑰茄细胞的生长, 而以 ρ (蔗糖)为 40 g/L 稍好; ρ (蔗糖)为 50 g/L 已过量, 在培养结束时尚有 32% 的总糖残留, 这与前述 ρ (蔗糖)为 50 g/L 对玫瑰茄细胞的生长已表现出基质抑制效应的结论是一致的.

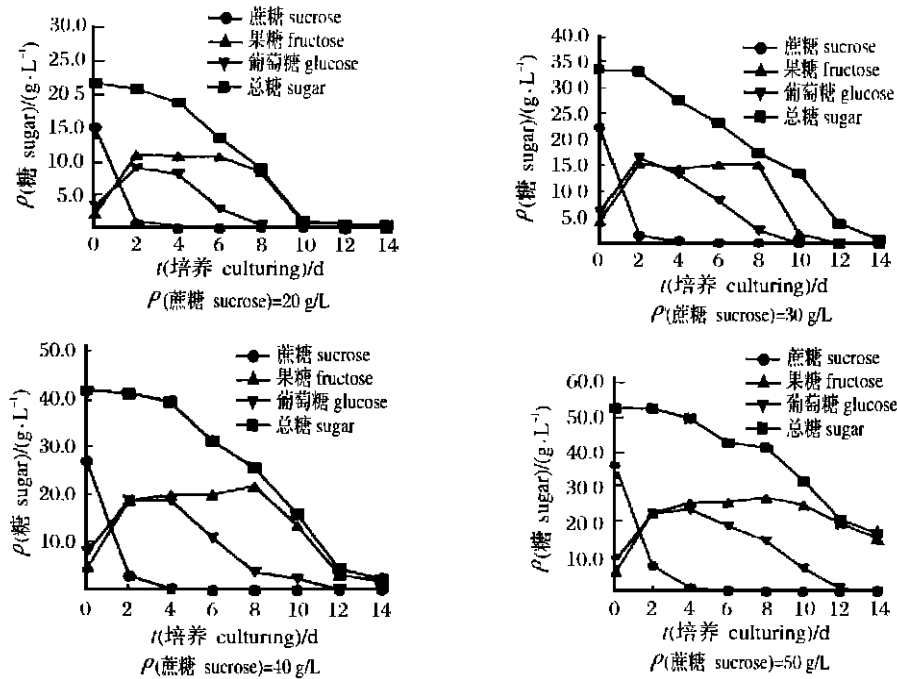


图3 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞培养基中残糖的变化曲线
Fig. 3 Time course of sugar in the medium under different sucrose concentration

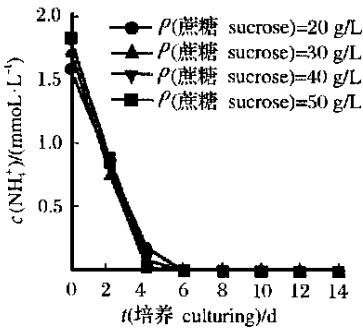


图4 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞对 NH_4^+ 的消耗曲线
Fig. 4 Time course of ammonium in the suspension culture of roselle cell under different sucrose concentration

2.4 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞对培养液中氮源的消耗规律

在 B_5 培养基中, 氮源以 NO_3^- 和 NH_4^+ 的形式提供, 其中 NO_3^- 为 25 mmol/L , NH_4^+ 为 2.0 mmol/L . NH_4^+ 的吸收在各蔗糖浓度下未表现出明显差异, 在

迟滞期间就被吸收殆尽; NO_3^- 的吸收在 ρ (蔗糖)为 $20\sim40\text{ g/L}$ 时未表现出明显差异; 而在 50 g/L 蔗糖质量浓度下, NO_3^- 却出现较大量的残留, 这可能是高糖浓度造成的高渗环境, 在抑制了细胞生长的同时, 也抑制了 NO_3^- 的吸收利用.

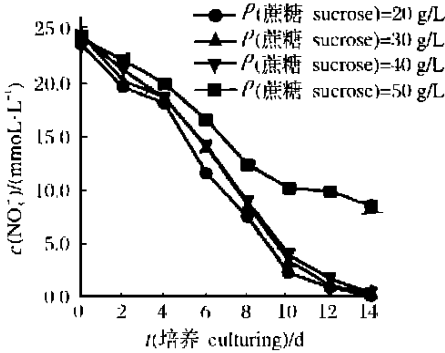


图5 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞对 NO_3^- 的消耗曲线
Fig. 5 Time course of nitrate in the suspension culture of roselle cell under different sucrose concentration

2.5 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞对培养液中磷酸根的消耗规律

Ashihara 等^[8]研究了磷酸盐限制和非限制下, 长春花细胞的初级代谢, 发现磷酸盐被快速吸收, 参与合成核苷酸、DNA、RNA、磷酸化糖及蛋白质, 24 h 后 ATP、6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖出现峰值, 而 DNA、RNA、蛋白质在 72 h 出现合成高峰, 随后细胞快速增殖. 由图 6 可知, 玫瑰茄细胞在迟滞期就将磷酸根大部分吸收, 在对数生长前期吸收完毕, 这种吸收方式与长春花细胞相似, 在 $\rho(\text{蔗糖})$ 为 20~50 g/L 时, 磷酸根的消耗速度大致相似, 只是在 50 g/L 蔗糖质量浓度下吸收稍慢, 可能是高渗抑制了细胞活力的缘故.

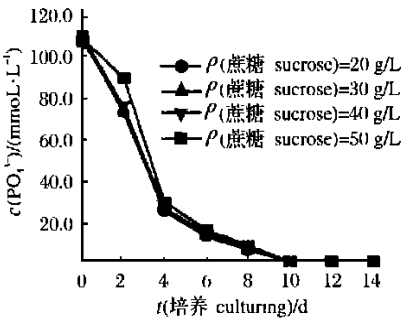


图 6 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养玫瑰茄细胞对 PO_4^{3-} 的消耗曲线
Fig. 6 Time course of nitrate in the suspension culture of roselle cell under different sucrose concentration

3 讨论

不同的植物细胞由于其遗传基础不同, 导致它们的培养行为并不完全相同, 如李弘剑^[9]用黄花蒿细胞所做的实验表明, 接种量 $\rho(\text{鲜细胞})$ 为 60 g/L, $\rho(\text{蔗糖})$ 为 50 g/L, 一个培养周期为 18 d; 王霜^[10]用大蒜细胞则采用大蒜 $\rho(\text{鲜细胞})$ 为 40 g/L 的接种量, $\rho(\text{蔗糖})$ 为 30 g/L. 我们用玫瑰茄细胞所做的实验则认为 30 g/L 的接种量和 30 g/L 的蔗糖是较佳

的实验组合. 在这个组合条件下, 细胞只需 14 d 便可获得最大生物量, 且其生长曲线能典型体现迟滞期、对数生长期、线性生长期、减慢期等过程; $\rho(\text{蔗糖})$ 为 30 g/L 也恰好够一个周期细胞的生长, 既非限制性营养源, 也并未表现出抑制效应; 从比生长速度来看也是最大的. 在研究清楚玫瑰茄细胞的基本生长行为后, 便可以此为基础进行逆境胁迫的进一步研究了.

参考文献:

[1] 侯学文, 郭 勇. 不同氮源对悬浮培养玫瑰茄细胞生长及硝态氮同化指征的影响[J]. 广西植物, 1998, 18(2): 246—248.
[2] 侯学文, 郭 勇. 不同碳源对悬浮培养玫瑰茄细胞主要基质消耗的影响[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 73—77.
[3] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 85—88.
[4] CATALDO D, HANSON M, SCHRADER L, et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid[J]. Commun Sci Plant Anal, 1975, 6: 71—80.
[5] URALA H, HANS M. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings[J]. Physiol Plantarum, 1990, 78: 379—378.
[6] 北京大学生物系生化教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 130—131.
[7] 罗建平, 郑光植. 人参培养细胞单细胞克隆的条件培养[J]. 生物工程学报, 1995, 11(1): 58—62.
[8] ASHIHARA H, TOKORO T. Metabolic fate of inorganic phosphate absorbed by suspension cultured cells of catharanthus roseus[J]. J Plant Physiol, 1985, 118(3): 227—237.
[9] 李弘剑. 黄花蒿细胞培养过程中细胞生长及青蒿素生物合成的调节控制[D]. 广州: 华南理工大学生物工程系, 1994.
[10] 王 霜. 大蒜细胞培养及产超氧化物歧化酶的动力学规律研究[D]. 广州: 华南理工大学生物工程系, 1998.

The Effects of Inoculum Amount and Sucrose Concentration on the Growth of Suspension Roselle Cell

HOU Xue-wen¹, GUO Yong²

(1 College of Resources and Environmental Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 Bioengineering Department of South China Univ. of Tech., Guangzhou 510641, China)

Abstract: The suspension roselle cell was used to study the effects of inoculum amount and sucrose concentration on its growth. The results were as follows: the bigger the inoculum amount was, the faster the roselle cell started to grow, but the smaller the specific growth rate was. From these facts, the density-dependent of cell starting to grow and density-inhibited of cell growth were proposed; Sucrose was limiting substrate from 2% to 4%; But from 4% to higher concentration, the sucrose showed inhibition effect on cell growth. The dual effects of sucrose on cell growth were apparently seen from the utilization of nutrients, such as sugar and nitrate.

Key words: inoculum amount; sucrose concentration; suspension culture; roselle cell