

文章编号: 1001-411X(2002)02-0040-04

主要营养成分对甘蔗叶悬浮细胞生长影响的研究

李 红, 邝炎华, 彭新湘

(华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642)

摘要: 研究了 MS 培养基的主要营养成分, 如不同初始磷酸盐浓度、不同氮源种类、不同氮源总量、不同糖种类及不同初始蔗糖质量浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响。结果表明: 在 MS 基本培养基中, 当初始磷酸盐浓度为 1.25 mmol/L, 氮源为 $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$, 且总量为 30 mmol/L, 碳源为蔗糖, 初始蔗糖质量浓度为 30 g/L 时, 甘蔗叶悬浮细胞的生长最佳。

关键词: 甘蔗; 悬浮细胞; 生长

中图分类号: Q552.2

文献标识码: A

本文是在研究了甘蔗基因型 US 66-56-9 叶片愈伤组织的诱导和悬浮细胞系建立的基础上展开的, 目的是为进一步探索甘蔗叶悬浮细胞在不同磷酸盐浓度下的生理生化特性提供参考。由于甘蔗叶悬浮细胞的生长状况直接影响不同磷酸盐浓度对甘蔗叶悬浮细胞的处理结果, 所以, 对于后期的研究工作而言, 研究 MS 培养基中的主要营养成分, 如不同初始磷酸盐浓度、不同氮源种类、不同氮源总量、不同糖种类及不同初始蔗糖质量浓度等, 对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蔗品系: US 66-56-9。

药品与试剂: 聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30, 上海伯奥生物科技有限公司进口分装); 2, 4-D (Sigma 公司); 琼脂(广东环凯生物科技有限公司分装); 酪蛋白(ICN Biochemical 公司); 其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂。

1.2 甘蔗叶片愈伤组织的诱导和悬浮细胞系的建立

甘蔗叶片愈伤组织的诱导和悬浮细胞系的建立参考 Murashige 和 Skoog^[1]、颜秋生等^[2]及陈彪等^[3]的方法。2001 年 6 月 6 日于广东省甘蔗科学研究所割取甘蔗 US 66-56-9 健壮蔗株尾鞘, 先剥去外面 2~3 层叶鞘, 然后用 φ 为 75% 酒精灭菌 30 s, 无菌水清洗 3 次后, 再切除外层和两端叶鞘, 露出淡黄色的心叶并留下生长点以上 1~5 cm 嫩叶, 用 0.2 g/L 的 PVP 溶液浸泡 20 min, 且不时摇动, 取出后用滤纸吸干多

余的水分, 1/2 环切后, 切成 0.5 cm×0.5 cm 的小片, 接入 MS 基本培养基+3 mg/L 2, 4-D+30 g/L 蔗糖+0.5 g/L 酪蛋白+100 mL/L 椰子汁+6 g/L 琼脂。接种完成后, 每瓶 10 片, 放置于黑暗处诱导愈伤组织, 每隔 15~20 d 进行继代培养。甘蔗叶片的愈伤组织继代 4 次后, 挑选淡黄色、疏松的愈伤组织移入 MS 基本培养基+3 mg/L 2, 4-D+30 g/L 蔗糖+0.5 g/L 酪蛋白+50 mL/L 椰子汁, 建立甘蔗叶悬浮细胞系。接种量为细胞干质量 2 g (以每升培养基里含量算, 下同), 悬浮培养条件: 温度 25℃, 全天光照, 光照强度 1 200 lx, 摇床转速为 120 r/min。

1.3 测定不同起始磷酸盐浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

标准 MS 培养基中 PO_4^{3-} 的浓度为 1.25 mmol/L (1P)。在试验中将 PO_4^{3-} 的浓度分别设为 0、0.312 5、0.625 0、0.937 5、1.250 0、2.500 0 及 5.000 0 mmol/L (即 0、1/4P、1/2P、3/4P、1P、2P 及 4P), 每一浓度设 5 个重复, 采用细胞干质量 2 g 的接种量, 其余培养条件不变, 测定摇瓶培养 9 d 后甘蔗叶悬浮细胞干质量, 即将细胞用多倍体积蒸馏水充分洗涤, 抽干水分, 然后在 60℃烘箱内烘干至恒质量, 干燥器中冷却后称取细胞干质量, 以研究不同起始磷酸盐浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响。

1.4 测定不同氮源种类对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

保持氮源总量为 60 mmol/L, 研究 7 种氮源组成对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$ 及 $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$ 、大豆蛋白胨、酪蛋

白水解物、尿素。每一氮源种类设 5 个重复, 采用细胞干质量 2 g 的接种量, 其余培养条件不变, 测定摇瓶培养 9 d 后甘蔗叶悬浮细胞干质量, 方法同 1.3。

1.5 测定不同氮源总量对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

在 MS 培养基中, 氮源总量为 60 mmol/L, 其中 $C(\text{NH}_4^+)$ 为 20 mmol/L, 而 $C(\text{NO}_3^-)$ 为 40 mmol/L, 即 $C(\text{NH}_4^+) : C(\text{NO}_3^-) = 1 : 2$ 。因此在保持该比例的前提下, 采用氮源总量分别为 0、20、40、60 及 80 mmol/L, 每一氮源总量设 5 个重复, 采用细胞干质量 2 g 的接种量, 其余培养条件不变, 测定摇瓶培养 9 d 后甘蔗叶悬浮细胞干质量, 方法同 1.3。

1.6 测定不同碳源对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

设定 15 g/L 果糖 + 15 g/L 蔗糖、15 g/L 葡萄糖 + 15 g/L 蔗糖、30 g/L 蔗糖、30 g/L 果糖、30 g/L 葡萄糖、30 g/L 麦芽糖及 30 g/L 乳糖等 7 种不同碳源, 每一碳源种类设 5 个重复, 采用细胞干质量 2 g 的接种量, 其余培养条件不变, 测定摇瓶培养 9 d 后甘蔗叶悬浮细胞干质量, 方法同 1.3。

1.7 测定不同初始蔗糖质量浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

设定 10、20、30、40、50 及 60 g/L 的 6 个不同初始蔗糖质量浓度, 每一蔗糖质量浓度设 5 个重复, 采用细胞干质量 2 g 的接种量, 其余培养条件不变, 测定摇瓶培养 9 d 后甘蔗叶悬浮细胞干质量, 方法同 1.3。

2 结果与分析

2.1 不同起始磷酸盐浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

磷在植物细胞代谢中起着重要作用, 它是核酸、生物膜及核苷酸的组成成分, 磷还参与体内的物质运输以及光能转变为化学能的过程。因此当植物细胞缺磷时, 细胞的分裂和增殖都不能发生。一般在培养基中提供的都是无机磷, 因为磷酸化的有机分子不能通过细胞膜; 无机磷进入细胞后, 可迅速同化为多种含磷的有机物, 也通常以 HPO_4^{2-} 或 H_2PO_4^- 的离子形式存在^[3]。

标准 MS 培养基中 PO_4^{3-} 的浓度为 1.25 mmol/L。因此在试验中将 PO_4^{3-} 的浓度分别设为 0、0.312 5、0.625 0、0.937 5、1.250 0、2.500 0 及 5.000 0 mmol/L, 以研究不同初始磷酸盐浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响(如图 1)。结果表明: 随着磷酸盐浓度的增加, 甘蔗叶悬浮细胞的细胞量也增加, 并在磷酸盐浓度为 1.25 mmol/L 时, 细胞干质量最大, 为 17.91 g; 当浓度升至 2.5 mmol/L 时, 细胞干质量开始下降, 所

以当初始磷酸盐浓度为 1.25 mmol/L 时, 甘蔗叶悬浮细胞的生长最佳。

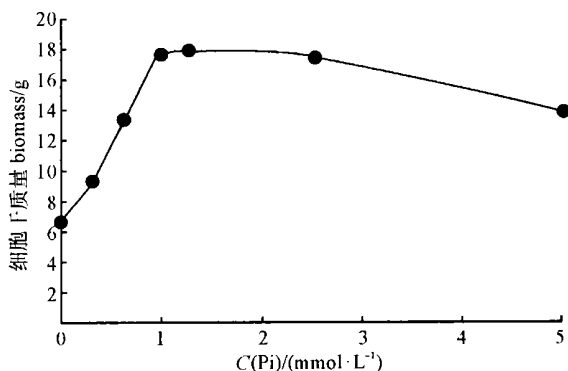


图 1 不同起始磷酸盐浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of the different initial phosphate concentration on biomass in suspension culture of sugarcane cell

2.2 不同氮源总量对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

在 MS 培养基中, 氮源总量为 60 mmol/L, 其中 $C(\text{NH}_4^+)$ 为 20 mmol/L, 而 $C(\text{NO}_3^-)$ 为 40 mmol/L, 即 $C(\text{NH}_4^+) : C(\text{NO}_3^-) = 1 : 2$ 。因此在保持该比例的前提下, 采用氮源总量分别为 0、15、30、45、60 及 80 mmol/L, 研究不同氮源总量对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响, 结果(图 2)显示: 甘蔗叶悬浮细胞的细胞量随氮源总量的升高而增加, 当氮源总量为 30 mmol/L 时, 甘蔗叶悬浮细胞的细胞干质量最大, 为 19.83 g, 随后缓慢下降。

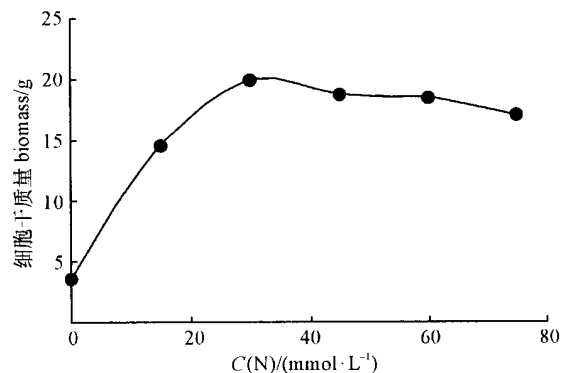


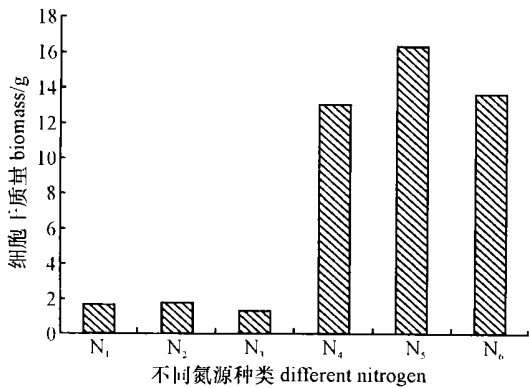
图 2 不同氮源总量对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

Fig. 2 Effects of the total quantities of nitrogen on biomass in suspension culture of sugarcane cell

2.3 不同氮源种类对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

氮源对植物细胞的生长是不可缺少的。不同氮源组成对细胞生长具有不同的影响。保持氮源总量为 60 mmol/L, 研究 7 种氮源组成对悬浮细胞生长的影响: 尿素、酪蛋白水解物、大豆蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$ 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{KNO}_3$ (图 3)。图 3 显示: 不同形式的铵盐与硝酸钾的组合均有利于甘蔗叶悬浮细胞生长, 说明 NH_4^+ 和 NO_3^- 作为无机氮源

提供的离子较易被甘蔗悬浮细胞吸收利用;在不同氮源种类条件下,甘蔗叶悬浮细胞的细胞量由大到小依次为: $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$ 、酪蛋白水解物、尿素及大豆蛋白胨,即 $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$ 的氮源组合能使甘蔗叶悬浮细胞的细胞干质量达到最大,为 16.34 g.



N₁: 尿素(urea); N₂: 10 g/L 酪蛋白降解物(casein enzymatic hydrolysate); N₃: 10 g/L 大豆蛋白胨(soya peptones); N₄: $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$; N₅: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{KNO}_3$; N₆: $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$

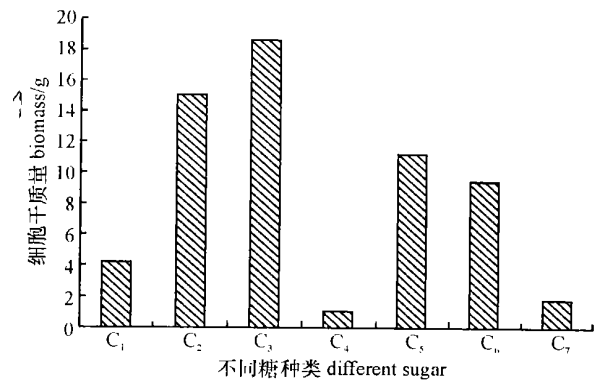
图3 不同氮源种类对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

Fig. 3 Effects of the different nitrogen on biomass in suspension culture of sugarcane cell

2.4 不同糖种类对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

糖类是植物组织和细胞培养中培养基的必要成分之一,它不仅是植物组织细胞生长所必需的碳源,也是维持细胞生长所要求的渗透稳定剂.由于不同植物、同一植物不同组织的细胞生长所要求的渗透压不同,对各种糖的降解和利用能力也不同.一般来说,植物细胞直接吸收的碳源多为单糖形式,用于提供各类代谢活动所需能量和合成各种胞内成分,而二糖和多糖类通常要经相应酶促水解为单糖形式才能被植物细胞直接利用.

在该试验中,分别研究了 15 g/L 果糖 + 15 g/L 蔗糖、15 g/L 葡萄糖 + 15 g/L 蔗糖、30 g/L 蔗糖、30 g/L 果糖、30 g/L 葡萄糖、30 g/L 麦芽糖及 30 g/L 乳糖等 7 种糖对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响,结果(图 4)表明:蔗糖、葡萄糖和果糖都是较容易被甘蔗细胞利用的碳源,其中以 30 g/L 蔗糖最有利于细胞生长;在不同碳源条件下,甘蔗叶悬浮细胞的细胞量由大到小依次为: 30 g/L 蔗糖、15 g/L 葡萄糖 + 15 g/L 蔗糖、30 g/L 葡萄糖、30 g/L 麦芽糖、15 g/L 果糖 + 15 g/L 蔗糖、30 g/L 乳糖及 30 g/L 果糖,且 30 g/L 的蔗糖能使甘蔗叶悬浮细胞的细胞干质量达到最大,为 18.63 g.



C₁: 15 g/L 果糖(fructose) + 15 g/L 蔗糖(sucrose); C₂: 15 g/L 葡萄糖(glucose) + 15 g/L 蔗糖(sucrose); C₃: 30 g/L 蔗糖(sucrose); C₄: 30 g/L 果糖(fructose); C₅: 30 g/L 葡萄糖(glucose); C₆: 30 g/L 麦芽糖(maltose); C₇: 30 g/L 乳糖(lactose)

图4 不同碳源种类对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

Fig. 4 Effects of the different sugar on biomass in suspension culture of sugarcane cell

2.5 不同初始蔗糖质量浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

蔗糖是植物细胞培养中最常用的碳源之一,它不仅作为能源物质,还能维持一定的渗透压^[4].不同浓度的蔗糖对细胞生长的影响显著.本试验分别研究 10、20、30、40、50 及 60 g/L 的不同初始蔗糖质量浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响,结果(图 5)表明:甘蔗叶悬浮细胞的细胞量随初始蔗糖质量浓度的提高而逐渐增加,当蔗糖质量浓度为 30 g/L 时,甘蔗叶悬浮细胞的细胞干质量最大,为 18.39 g,而后随蔗糖质量浓度的进一步升高而降低.这可能是由于在低糖浓度下,细胞生长随糖的耗尽而停止,而在高糖培养基中,由于高渗透压环境使细胞对培养基中其他营养物质的吸收有一定的抑制作用.

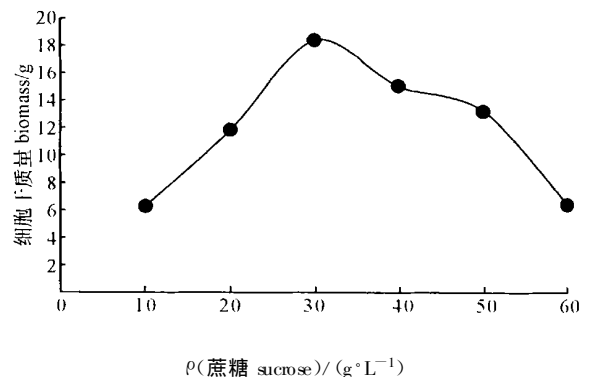


图5 蔗糖的不同初始质量浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响

Fig. 5 Effects of the different initial sucrose concentration on biomass in suspension culture of sugarcane cell

3 结论

本文研究了 MS 培养基的主要营养成分, 如不同初始磷酸盐浓度、不同氮源种类、不同氮源总量、不同糖种类及不同初始蔗糖质量浓度对甘蔗叶悬浮细胞生长的影响, 研究结果表明: 在 MS 基本培养基中, 当初始磷酸盐浓度为 1.25 mmol/L, 氮源为 $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$, 且总量为 30 mmol/L, 碳源为蔗糖, 初始蔗糖质量浓度为 30 g/L 时, 甘蔗叶悬浮细胞的生长最佳. 所以, 在对甘蔗叶悬浮细胞进行不同磷酸盐处理, 以研究其生理生化特征的研究过程中, 可根据上述结果, 培养出生长状态最佳的甘蔗叶悬浮细胞以供研究.

参考文献:

- [1] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473—497.
- [2] 颜秋生, 张雪琴, 陈正华. 甘蔗原生质体的器官分化[J]. *科学通报*, 1985, 30: 301—303.
- [3] 陈 彪, 陈伟栋, 梁钾贤, 等. 利用聚乙烯吡咯烷酮防止甘蔗组织培养接种物褐变的研究[J]. *华南农业大学学报*, 1999, 20(3): 63—66.
- [4] 陈世和, 陈建华, 王士芬. *微生物生理学原理*[M]. 上海: 同济大学出版社, 1992. 31—32.
- [5] 潘瑞炽. *植物组织培养*[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2000. 18.

Studies on the Effects of Major Nutrients on Suspension Culture of Sugarcane Leaf Cell

LI Hong, KUANG Yan-hua, PENG Xin-xiang

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effects of major nutrients in MS medium on suspension culture of sugarcane cell were studied, including different initial phosphate concentration, different nitrogen, total quantities of nitrogen, different sugar, different initial sucrose concentration. The results indicated that when the initial phosphate concentration was 1.25 mmol/L, the nitrogen was $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$, the total quantities of nitrogen was 30 mmol/L, the sugar was sucrose and its initial concentration was 30 g/L, the growth of suspension culture of sugarcane cell was the best.

Key words: sugarcane; suspension cell; growth

【责任编辑 柴 焰】