

西洋参愈伤组织悬浮培养基中 蔗糖和无机元素的消耗状况

张美萍, 王 义, 孙春玉, 李向高

(吉林农业大学, 吉林 长春 130118)

Study on the consumption of sucrose and inorganic elements in the basal media of suspension culture of *Panax quinquefolium* Linn. callus ZHANG Mei-ping, WANG Yi, SUN Chun-yu, LI Xiang-gao (Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(3): 60-61

Abstract: The consumption of sucrose and inorganic elements in the basal media of suspension culture with the callus from buds of *Panax quinquefolium* Linn. was analysed. The results showed that after culturing a generation, the consumption rate of sucrose was 80%, that of macroelements was $P > N > Fe > Mg > K > Ca$, that of microelements was $Mo > Cu > B > Co > Mn > Zn$.

关键词: 西洋参; 悬浮培养; 基质消耗

Key words: *Panax quinquefolium* Linn.; suspension culture; media consumption

中图分类号: Q943.1; S565.5*3 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)03-0060-02

植物离体培养所采用的基本基质大多数是广谱性的, 各种营养成分是否被充分利用因植物种类不同而异, 这方面的研究报道较少^[1-3], 尤其在西洋参(*Panax quinquefolium* Linn.) 芽胞愈伤组织悬浮培养中尚未见报道。本实验通过对西洋参愈伤组织培养基中蔗糖和无机元素消耗的研究, 确定培养周期中碳源和无机元素的用量, 为西洋参大规模细胞培养中碳源和无机元素及时补充和起始供给浓度的确定提供参数。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养条件

采用本实验室在 1999 年筛选的西洋参芽胞愈伤组织无性系作为实验材料。先将固体培养基上的愈伤组织转入含有 20 mL 培养液的三角瓶中, 继代 4~5 次, 获得了细胞分散度好而且较均匀的悬浮培养系。将 0.8 g 鲜细胞接种到含 20 mL 培养液的三角瓶内, 培养液为 MS 附加 0.5 mg/L 2,4-D、2 mg/L IBA 和 0.5 mg/L BA, 初始蔗糖浓度 3%, 初始 pH 6.0, 摇床转速为 100~110 r/min, 温度(23±2)℃, 暗培养 40 d。每隔 5 d 随机取样, 每次 3 瓶, 重复 2 次, 作生长曲线, 并测定蔗糖含量。培养 30 d 时取样测定无机元素含量。

1.2 细胞生长量的测定

以鲜重(g/flask)作生长指标, 具体方法见文献^[4]。

1.3 蔗糖消耗量测定

在无培养物的基质中, 蔗糖浓度按 0%、0.75%、1.5%、2.25% 和 3% 添加, 采用常规蒽酮法^[5,6], 于 640 nm 处测消光度值, 制作蔗糖标准曲线 $Y = 150.4954X - 0.3056$ 。待测基质消光度值按同法测定, 并利用标准曲线求出蔗糖含量。再按下列公式计算消耗量: 消耗量(%) = [(培养基中起始蔗糖的浓度 - 培养基中剩余蔗糖浓度)/培养基中起始蔗糖的量] × 100%。其中基质中起始蔗糖浓度为 3%。

1.4 无机元素消耗量测定

将新配置的培养液和培养一代的培养液蒸干, 加入 V (硝酸): V(高氯酸) = 4:1, 浸泡 48 h 后, 消化, 用 0.1 mol/L HNO₃ 定容至 25 mL, K 和 Na 用 Z-8000 型偏振塞曼原子吸收分光光度计测定, 其余元素用美国产 Mark II 型 800 系列等离子直读光谱仪测定。方法见文献^[7]。元素消耗量(%) = [(培养基中起始无机元素的浓度 - 培养基中残留的无机元素的浓度)/培养基中起始无机元素的浓度] × 100%

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织生长曲线

西洋参愈伤组织悬浮培养生长曲线见图 1。从图 1 看出, 培养物的生长曲线符合“S”型, 经过 5 d 的延迟期后, 进入对数生长期, 15 d 后进入快速生长期, 30 d 左右达到最大生长量, 以后进入静止期, 因此本实验体系的生长周期为 30d。

2.2 基质中蔗糖的消耗

西洋参愈伤组织培养基中蔗糖残量变化见图 2。从图 2 可见, 随着细胞的生长, 蔗糖逐渐被消耗。在延迟期蔗糖消耗较慢, 进入快速生长期蔗糖消耗量增大, 进入静止期蔗糖只消耗 80% 左右。说明本实验在培养基中添加的 3% 蔗糖, 足以维持细胞生长一代时所需碳源。

培养基中蔗糖的消耗因植物种类、培养体系和生长状态的不同而有所差别。如侯学文^[1]在研究玫瑰茄细胞悬浮培养时, 发现蔗糖第 4 天就全部分解为葡萄糖和果糖, 第 16 天

收稿日期: 2003-02-10

基金项目: 国家科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目 (00C26N2210138)

作者简介: 张美萍(1964-), 女, 吉林长春人, 博士, 副教授, 主要从事药用植物细胞工程学研究。

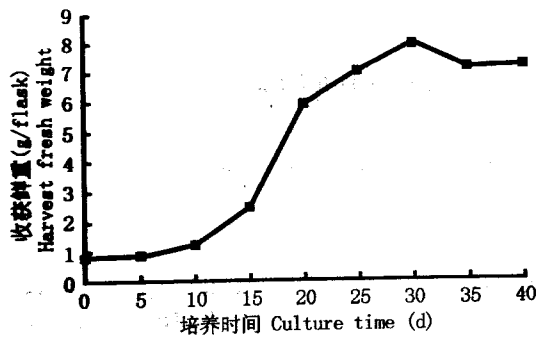


图1 西洋参愈伤组织悬浮培养生长曲线
Fig. 1 Growth curve of *Panax quinquefolium* Linn. callus with suspension culture

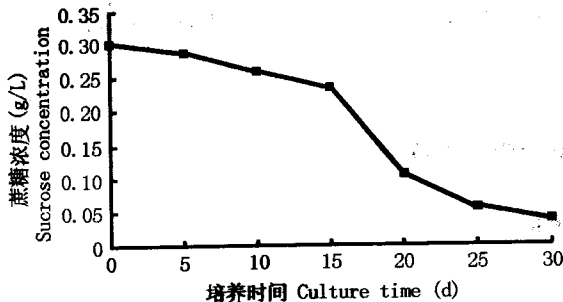


图2 西洋参愈伤组织悬浮培养基中蔗糖含量的变化曲线
Fig. 2 Changing curve of sucrose concentration in medium of suspension culture of *Panax quinquefolium* Linn. callus

葡萄糖和果糖全部被吸收利用,在以后细胞生长时无碳源供给,生长受阻。

蔗糖在培养基中不仅起着碳源供给作用,还有维持培养基渗透压的作用,蔗糖浓度过低,不足以满足生长、发育、代谢和维持渗透压的需要;浓度过高,不利于降低生产成本,可见起始蔗糖浓度的确定是非常关键的。

2.3 基质中无机元素的消耗

西洋参愈伤组织培养 30 d 时,培养基中无机元素的含量见表 1。从表 1 可看出,大量元素消耗量依次为 P>N>Fe>Mg>K>Ca,它们的消耗率分别为 31%、22.5%、17%、15%、9.5%和 9%;微量元素消耗依次为 Mo>Cu>B>Co>Mn>Zn,它们的消耗率分别为 50%、32%、21%、19%、10.05%和 5%。所有无机元素均没有消耗殆尽。

在大量元素中,无机磷消耗量最大,You-ichiroh 等的研究也发现 PO₄³⁻消耗最快^[2]。总氮源消耗量次之。在培养基中总氮源由硝酸盐和铵盐提供。植物细胞有快速利用铵盐合成氨基酸的能力,因此在生长良好的培养基中,细胞开始启动生长时,首先消耗 NH₄⁺,而硝酸盐则必须经过代谢还原才能利用。细胞生长速度快,氮源的消耗也加快。

Fe 和 Mg 是一些酶的辅酶,而且它们参与 NO₃⁻还原过程中的亚硝酸还原酶的催化反应,在整个细胞生长过程中,酶系统处于活化状态,且培养基中 NO₃⁻的利用率也很高,因此 Fe 和 Mg 的消耗量也较大。微量元素中 Mo 参与 NO₃⁻的

转化过程,消耗量较大,其他微量元素可能构成酶的辅酶、酶的激活剂。

表 1 西洋参愈伤组织悬浮培养一代基质中各无机元素的消耗率¹⁾
Table 1 Consumption rate of inorganic elements in medium of suspension culture after culturing a generation of *Panax quinquefolium* Linn. callus¹⁾

元素 Element	1	2	消耗率(%) Consumption rate
N	941.850 0	729.930 0	22.50
Ca	142.970 0	130.100 0	9.00
Mg	75.870 0	64.490 0	15.00
K	1 120.200 0	1 013.780 0	9.50
P	41.590 0	28.700 0	31.00
Fe	12.324 7	10.230 0	17.00
B	1.515 7	1.200 0	21.00
Mn	4.054 7	3.630 0	10.05
Zn	3.934 0	3.740 0	5.00
Mo	0.115 6	0.060 0	50.00
Cu	0.070 6	0.050 0	32.00
Co	0.012 9	0.010 0	14.00

¹⁾ 1: 初始培养基中无机元素的浓度 Inorganic element concentration in initial culturing medium (mg/L); 2: 培养一代后基质中无机元素的浓度 Inorganic element concentration in medium of culturing a generation (mg/L)

3 讨 论

通过对培养基中蔗糖和无机元素消耗量的测定,可研究下列问题:(1) 可以确定整个继代周期中碳源和无机元素的供给量是否充足,这为确定碳源和无机元素的起始供给浓度提供参数,以确定培养基中各元素的合理配比,降低成本。(2) 为确定培养周期提供理论依据。(3) 用于轮作及轮作机理的研究。(4) 为大规模细胞培养及时供给碳源、无机盐提供参数。(5) 可用于蔗糖、无机元素的代谢机理研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] You-ichiroh M, Shizufumi T. Essential oil production in shoot of *Lavandulavera* by liquid culture[J]. Bull Fac Agr Saga Univ, 1997, 82: 43-51.
- [3] 张美萍,王 义,李向高,等. 不同培养基及其元素组成对西洋参愈伤组织悬浮培养物生长和皂苷含量的影响[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(2):14-16.
- [4] 张美萍,王 义,李向高. 西洋参组织培养及皂苷含量分析[J]. 吉林农业大学学报,1999,21(1):12-15.
- [5] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社,1992.
- [6] 白宝章. 植物生理学测试技术[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993.
- [7] GB12393/96/97/98-90. 食物中磷、铁、锰、钙、钾等的测定方法[S].