

不同激素对银柴胡细胞生长及营养成分消耗的影响

邓光存, 彭 励, 杨彩荣, 吴晓玲

(宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 采用液体培养基悬浮培养的方法, 研究4种不同激素培养基对银柴胡悬浮细胞的生长特性及营养物质的代谢规律的影响, 结果表明: 当培养到16 d时, M₄处理(MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L)的细胞鲜重、干重、细胞数目均明显高于其他处理; 而M₄处理的可溶性糖的含量在16 d时处于最低水平; M₄处理的电导率在整个培养过程中均高于其他处理; 培养到4 d时各处理的磷已消耗60%以上, 表明磷是银柴胡细胞生长的限制性因子; 硝态氮的吸收主要集中在4 d以后。

关键词: 银柴胡; 细胞悬浮培养; 动力学

中图分类号: S143.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2006)06-0107-05

银柴胡 (*Stellaria dichotma* L. var *lanceolata* Bge.), 为石竹科多年生草本植物, 别名牛胆根、沙参儿^[1], 其根干燥后可入药称“银柴胡”, 具清虚热、除疳热的作用^[2]。银柴胡主产于宁夏、陕西、甘肃、内蒙等地, 且多野生于干旱少雨、气候炎热、沙丘起伏的荒漠草原上, 或岩石缝及碎石中, 为宁夏的道地性药材。近年来, 随着对银柴胡开发的不断深入, 国内外需求量大增, 由于野生资源已近枯竭, 各地开始进行广泛种植, 但由于银柴胡生长条件的特殊性, 人工栽培技术还不成熟, 栽培品不能满足现在市场的需求, 目前供应偏紧^[3]。随着植物组织培养技术的大力发展, 植物细胞培养法, 被认为是解决银柴胡长期资源的一个非常有效的手段, 在世界范围内正受到极大关注^[3]。而且银柴胡的药用成分甾醇主要在根部, 但其生长周期较长, 而利用细胞培养可有效提高其有效成分的合成速率, 缩短生产周期, 为工厂化生产银柴胡细胞, 提取有效成分提供科学依据^[3]。

本试验在50 ml摇瓶中, 通过对银柴胡进行细胞培养, 研究了银柴胡细胞的生长规律及不同植物生长调节剂配比对pH、电导率的变化规律和可溶性糖、磷及硝态氮等营养物质消耗规律等的影响, 以期获得银柴胡细胞培养的最佳培养基配方, 为用细胞悬浮培养法进行银柴胡大规模培养奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

银柴胡种子购自宁夏平罗县种子分公司, 在实验

室盆栽一个月后, 以幼嫩叶片为外植体接种到MS培养基中, 具体配方为MS+6-BA(1.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)+2,4-D(1.0 mg/L), 于25±1℃, 黑暗条件诱导出疏松的愈伤组织备用。

1.2 试验设计

采用由4种激素配比的液体培养基对银柴胡进行液体悬浮培养:

M₁: MS+6-BA(2.0 mg/L)+2,4-D(2.0 mg/L);

M₂: MS+6-BA(1.0 mg/L)+2,4-D(1.0 mg/L);

M₃: MS+6-BA(0.5 mg/L)+2,4-D(0.5 mg/L);

M₄: MS+6-BA(0.5 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)+2,4-D(0.5 mg/L)。

培养基基本成分为MS培养基, 蔗糖30 g/L, pH=5.8。各处理均为相同50 mL三角瓶加入液体培养基30 mL, 黑暗条件培养, 培养温度25±1℃, 供氧充分, 140 r/min振荡。

1.3 试验方法

在无菌条件下, 精确称取色泽鲜嫩、疏松易碎的银柴胡愈伤组织2.000±0.001 g, 分别接种于相应编号的三角瓶中, 每种处理重复三瓶。

1.4 数据统计

1.4.1 愈伤组织鲜重与干重的测定 各处理每4 d各取3份, 之前先称量干纱布重量并记录, 后用已知重量的纱布滤去水分, 并用滤纸将纱布残余水分吸数次, 再称其重量并记录, 减去纱布重量即为细胞鲜重, 然后将盛有愈伤组织的纱布置于80℃烘干至恒重, 称其重量为干重。

收稿日期: 2006-03-31

基金项目: 宁夏教育厅资助项目(JY2002140); 宁夏大学自然科学基金资助项目(NS0404)

作者简介: 邓光存(1974—), 男, 硕士, 讲师, 从事发酵工程方面的研究和教学工作。

通讯作者: 吴晓玲(1973—), 女, 硕士, 讲师, 从事细胞工程方面的研究和教学工作

1.4.2 细胞计数 各处理每 4 d 于无菌条件下用血球计数板,采用显微镜直接计数法^[4],测定其细胞数,须确保愈伤组织不被污染。细胞计数为 1 mL 培养基中的总细胞数,式为:

$$1 \text{ ml 培养基中的总细胞数} = A \times 10^4$$

式中, A 为细胞计数板每个大方格的细胞数。

1.4.3 pH 值 各处理每 4 d 各取 3 份,将过滤后的培养液,用精密 pH 试纸检测其 pH 值。

1.4.4 电导率的测定 各处理每 4 d 各取 3 份,将过滤后的培养液,用电导仪检测其电导率。

1.4.5 可溶性糖含量的测定 采用苯酚法测定可溶性糖含量^[5]。先以糖含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,并建立回归方程: $y = 0.2806 + 133.89x$ (x 为吸光度, y 为糖含量)。

各处理每 4 d 各取 3 份测定,按下式计算测试样品的糖含量。

$$\text{可溶性糖含量} = \frac{\text{由回归方程计算出的糖的含量} \times \text{稀释倍数}}{\text{测定用样品液的体积}}$$

1.4.6 磷含量的测定 采用钼蓝法测定磷含量^[6]。

以磷的浓度为横坐标,光密度为纵坐标,绘制标准曲线,并建立回归方程 $y = 0.136 + 19.093x$ (x 为吸光度, y 为磷含量)。各处理每 4 d 各取 3 份测定,根据下式计算出培养基中磷含量。

$$\text{磷含量} = \frac{\text{由回归方程计算出的磷的含量} \times \text{稀释倍数}}{\text{测定用样品液的体积}}$$

1.4.7 硝态氮含量的测定^[5] 先以硝态氮浓度为

横坐标(x),吸光度为纵坐标(y),绘制标准曲线,并建立回归方程 $y = 0.01215 + 0.01286x$ 。

各处理每 4 d 各取 3 份根据下式计算出硝态氮含量。

$$\text{样品中硝态氮含量} = \frac{\text{由回归方程计算出的硝态氮的浓度} \times \text{稀释倍数}}{\text{测定吸取样品的体积}}$$

2 结果与分析

2.1 不同培养时期各处理银柴胡细胞的鲜重与干重比较

方差分析结果表明,各处理鲜重在细胞培养的整个时期差异均达到极显著水平($P < 0.01$); M_4 处理的银柴胡细胞鲜重和干重均高于其他三种处理(见表 1,图 1),这是由于此激素配比能够有效促进细胞伸长、分裂和体积扩大,进而使细胞质的产生量增加,从而促进细胞增重; M_2 处理中,不含有生长素 2,4-D,由于生长素和细胞分裂素的结合使用对植物细胞的生长具有协同作用,液体悬浮培养中,激素与植物材料直接接触,故适当降低激素浓度适于植物细胞的生长,这与樊君等^[7]对伊贝母细胞悬浮培养研究的试验结果一致。各处理细胞在培养期间均可分为迟滞期、对数生长期、减慢期、静止期和衰亡期,这与红豆杉细胞的生长曲线走势相同^[8],银柴胡细胞在前 16 d 生长较慢,在 16 d 时其细胞干重达最高。因此银柴胡细胞生长速度较快,培养周期也短,有利于大规模培养。

表 1 不同培养时期各处理银柴胡细胞鲜重(g)

Table 1 The fresh weight of all the treatments in different stage

培养基 Treatment	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d
M_1	0.211	0.315	0.366	0.393	0.210	0.167
M_2	0.178	0.218	0.268	0.277	0.196	0.172
M_3	0.225	0.320	0.343	0.382	0.203	0.178
M_4	0.173	0.212	0.351	0.415	0.207	0.173
F	1916.75**	10539.42**	5096.89**	11304.75**	110.00**	61.00**

2.2 不同培养基处理对银柴胡愈伤组织细胞数的影响

由图 2 可得,各处理银柴胡细胞数量随时间进程延长而增加,在培养到第 16 d 时,其细胞数出现一个峰值,之后又趋于下降。其中 M_4 处理在各个时期均高于其他处理,这说明 M_4 处理中,浓度均为

0.5 mg/L 的 2,4-D 和 NAA 有效诱导细胞伸长,0.5 mg/L 细胞分裂素 6-BA 有效促进银柴胡细胞分裂,使得细胞增殖很快;而培养到 16 d 时各处理中营养成分已不能满足细胞增殖需要,需重新转接,补充新鲜培养液。

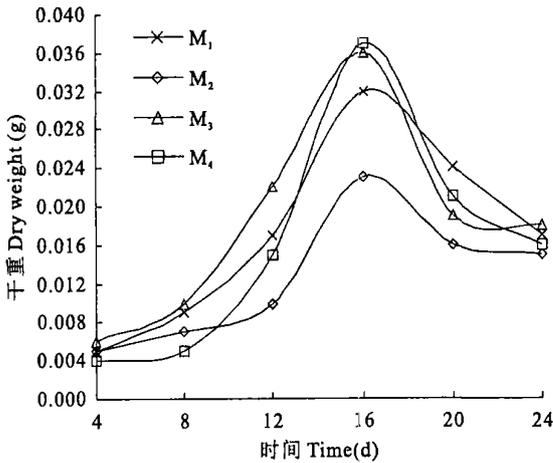


图 1 不同培养基对细胞干重的影响

Fig. 1 The effects of mediums on cell dry weight

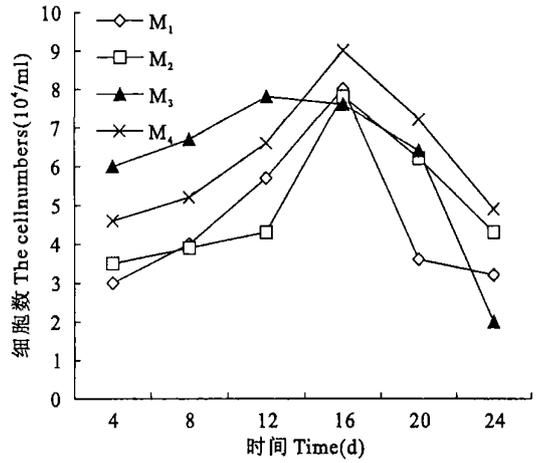


图 2 不同培养基处理对银柴胡细胞数的影响

Fig. 2 The effects of mediums on the cell numbers of starwort

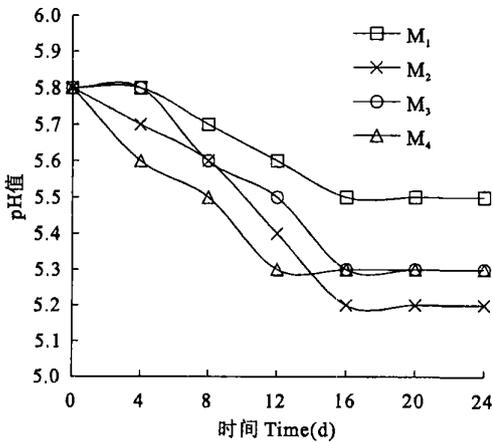


图 3 不同培养基处理对 pH 值的影响

Fig. 3 The effects of mediums on pH

2.3 不同培养时期不同培养基处理对 pH 值影响

由图 3 可知,在悬浮培养细胞的过程中,pH 值在开始的一段时间内,逐渐降低,在细胞生长量达最大时,降至最低,以后几乎维持不变。这种变化的原因有两个,首先,pH 值的变化与细胞新陈代谢中释放的有机酸的产生有关^[9],在生长周期的前一阶

段,培养细胞代谢旺盛,呼吸强度大,有机酸增加,可能造成 pH 值下降^[10];另外,细胞培养中阴阳离子不等量的吸收也是一个可能原因^[9],在细胞培养的前一阶段主要以 NH_4^+ 作为氮源,即细胞生长主要消耗阳离子,故 pH 值下降^[10],但培养过程中的微小变化并不影响细胞的生长状况^[9]。在对数生长期过后,由于磷盐的消耗使溶液趋向于碱性,与后期细胞大量生成含有酚羟基的相关化合物的酸性相中和,进而维持培养基 pH 值的恒定^[10]。同时就各培养基而言, M_1 处理中的 pH 值在培养期间始终高于其他处理,这可能是由于它的细胞数较少,产生的有机酸相对较少而致。

2.4 不同培养基处理对银柴胡电导率的影响

由表 2 可知,不同培养基处理银柴胡愈伤组织细胞,在细胞培养的整个过程中差异均达极显著水平 ($P < 0.01$);在细胞悬浮培养过程中,随着培养时间的延长,电导率逐渐降低,当细胞生长达到高峰时,电导率也相应降低至低谷,在后期培养阶段,电导率有回升趋势,这与余斐等^[11]关于电导率法测定红豆杉细胞的生长的试验结果一致。

表 2 不同培养时期各处理对银柴胡培养基电导率的影响(mS)

Table 2 The effects of mediums on electrolytic leakage in different period

培养基	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d
M_1	2.98	2.36	2.06	1.98	1.97	2.25
M_2	2.63	2.13	1.98	1.64	1.65	2.03
M_3	3.12	2.83	2.31	2.05	2.01	2.35
M_4	3.82	3.41	2.90	2.30	2.34	2.77
F	7484.75**	34.80**	5194.75**	2222.75**	2388.75**	2952.75**

分析其可能原因有,电导率表现了溶液中离子强度的高低,它与细胞中变化较大的组分诸如

RNA、DNA、氮或碳的含量无关,而与培养液中的离子浓度有关^[11];也有证据显示电导率的降低主要是

因为培养液中硝酸盐的吸收^[12], 陈士云等人^[13]在培养紫草细胞时发现, 培养液的电导率在培养初期呈下降趋势, 当次代谢产物的积累到一定程度时电导率不再下降。在细胞培养的前一阶段, 细胞需消耗大量的营养成分以使细胞迅速生长, 因而电导率降低; 而在衰亡期可能由于细胞死亡破碎而导致培养液中离子逐渐增加, 故电导率有上升趋势^[14]。

2.5 不同培养时期不同培养基处理银柴胡可溶性糖含量的对比

由图 4 可知, 各处理糖含量在指数生长期都迅速下降, 细胞进入静止期糖消耗速率也有所下降, 反映了此时糖的消耗只用于维持细胞生命活动及产物合成, 而对数生长期中, 大量糖耗用于细胞物质的构建^[15]。和其他处理相比, M₃ 处理其糖含量在 16 d 前均处于较低水平, 这与其细胞数和鲜重是一致的。

2.6 不同培养基处理对银柴胡磷含量影响

由表 3 分析可知, 不同培养基处理磷含量在细胞培养第 4、8、16 d 具极显著差异 ($P < 0.01$)。培养初期培养基中的磷被大量消耗, 培养基中的起始磷浓度为 1.25 mmol/L, 从细胞生理代谢过程推断, 在延迟期(0~4d)细胞大量吸收磷, 合成细胞生长所需的 ATP、RNA、DNA 及蛋白质等等, 然后细胞才

能快速繁殖进入对数生长期^[15], 故细胞在生长的前期, 培养基磷含量急剧下降; 同时, 也说明磷是细胞生长的限制性基质, 这与阮茜等关于磷限制培养中玫瑰茄细胞生长及花青素形成动力学的报道一致^[16], 因此, 在培养初期, 要具备足够的磷才能保证细胞的正常生长, 在细胞培养后期, 培养基中又出现了少量的磷, 这可能是由于部分细胞裂解、把胞内磷释放出来的缘故^[8]。

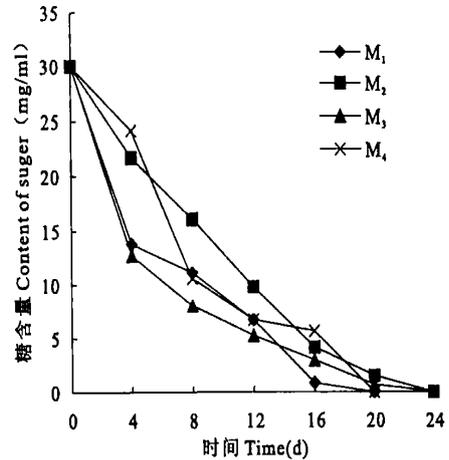


图 4 不同时期不同培养基处理糖含量变化

Fig. 4 The curve of sugar content of mediums in different period

表 3 不同培养基处理对银柴胡磷含量的影响 (mmol/L)

Table 3 The effects of mediums on content of phosphor

培养基 Treatment	0 d	4 d	8 d	12 d	16 d	20d	24 d
M ₁	1.25	0.33	0.21	0.16	0.03	0.00	0.03
M ₂	1.25	0.35	0.20	0.13	0.07	0.00	0.02
M ₃	1.25	0.37	0.24	0.15	0.02	0.00	0.04
M ₄	1.25	0.30	0.16	0.12	0.01	0.00	0.04
F	0.00 ^{ns}	26.75 ^{**}	32.75 ^{**}	3.38 ^{ns}	20.75 ^{**}	0.00 ^{ns}	2.75 ^{ns}

2.7 不同培养时期不同培养基处理银柴胡硝态氮含量对比

硝态氮的含量在细胞培养的延迟期(0~4 d)消耗较少, 而在 4d 以后消耗极为快速。因为胞外过量的 NH_4^+ 对细胞有毒害作用, 它必须有较快的消除机制, 所以在前 4 d 主要消耗 NH_4^+ , 将其全部转入胞内以有机氮的方式储存起来, 供细胞逐步利用, 而植物对 NO_3^- 有较好的耐受能力, 因而消除速度较慢^[17], 仅在 4~20 d 内出现较大程度的降低, 第 21 d 之后, 硝酸根离子已基本不再被利用, 这对应于培养基中糖的耗尽和细胞量的开始下降 (见图 5)。

3 结论与讨论

1) 各处理细胞在培养期间可分为迟滞期、对数生长期、减慢期、静止期和衰亡期, 在培养至第 16 d

时达到峰值, 之后趋于下降, 因此对银柴胡细胞而言, 在接种 16 d 后就应进行继代培养; 而 M₄ (MS+6-BA0.5+2,4-D0.5+NAA0.5) 处理在各个时期其细胞干重和鲜重明显高于其他处理。可能是由于此激素配比利于银柴胡细胞的生长。在组织培养中, 生长素能够诱导细胞分裂, 促进细胞伸长, 一般生长素在低浓度时可促进生长, 浓度较高则会抑制生长, 高浓度甚至会使植物受伤。细胞分裂素主要作用是促进细胞分裂, 有试验证实, 胡萝卜根的韧皮部薄壁细胞放在含有全部营养物质、维生素以及其他植物生长物质而没有细胞分裂素的培养基中, 细胞很少分裂, 生长极少^[18], 此外, 它还可以使细胞体积加大, 但细胞分裂素和生长素不同的是, 细胞分裂素主要使细胞扩大, 这是由于细胞分裂素能增加细胞壁的可塑性, 细胞壁松弛, 使得细胞吸水扩大^[19]。因此适合的激素

搭配会增加细胞分裂的频率,使细胞数量增加。

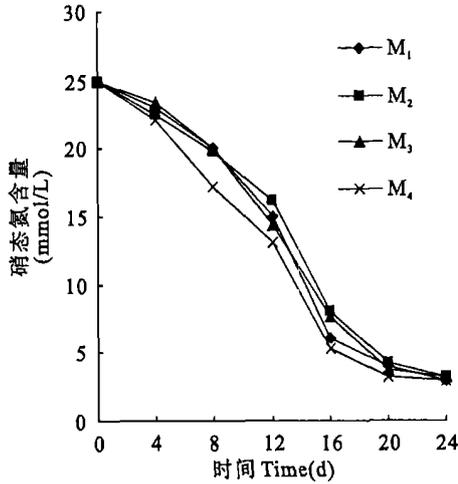


图 5 不同培养时期各处理硝态氮含量变化

Fig. 5 The curve of the content of nitrate nitrogen in different period

2) 银柴胡细胞培养中的 pH 的变化和电导率的变化受许多因素的影响,这里主要研究离子电荷和浓度的影响,在不同的培养时期吸收不同的离子引起其变化,同时也表现了不同营养物质对其的影响。各处理 pH 和电导率在 0~4 d 下降较慢,4 d 后急剧下降,这是因为离子被大量吸收,16 d 时达最低水平;M₄ 处理的 pH 相对较低,这与细胞数较多产生的有机酸也比较多有关。

3) 在细胞培养至 4 d 时,各处理磷含量已消耗大半,因此,在低磷浓度时,磷是细胞生长的限制性基质^[16],对银柴胡细胞而言,MS 培养基中磷含量过低,要完全满足细胞生长必需另外补充磷。在细胞生长的对数生长期可溶性糖消耗极为迅速,这与细胞的鲜重、干重及细胞数的高峰期一致;在银柴胡细胞生长的过程中,硝态氮的吸收主要集中在 4 d 之后,此时硝态氮的含量急剧下降,24 d 时处于一个

较低水平,这与其本身对植物细胞生长的影响有关。

参考文献:

- [1] 王寿希,王晓燕,左桂芬.银柴胡的引种栽培[J].特种经济动植物,2002,(1):32-34.
- [2] 杨小军,丁永辉.银柴胡资源及其可持续利用的研究[J].中药材,2004,27(1):7-8.
- [3] 吴晓玲,谢亚军,巫鹏举,等.植物生长调节剂对银柴胡细胞生长特性的影响[J].植物研究,2005,25(1):79-82.
- [4] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社(第三版),2000.90-92.
- [5] 李合生.《植物生理生化实验原理和技术》[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [6] 邹琦.《植物生理生化实验指导》[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [7] 樊君,朱四易,李宝璋.伊贝母细胞悬浮培养的研究[J].西北大学学报(自然科学版),1995,25(6):656-657.
- [8] 王红强,钟建江,陈旭峰,等.中国红豆杉悬浮培养动力学研究[J].华东理工大学学报,1997,23(6):679-682.
- [9] 原晓勇,张来琦,李宝璋,等.西洋参悬浮细胞培养条件的研究[J].西北大学学报(自然科学版),1994,24(1):51-55.
- [10] 曹孟德,秦东春,陈奇才,等.香荚兰细胞悬浮培养产生香兰素的研究[J].华中理工大学学报,1998,26(5):8-10.
- [11] 余斐,张姝,刘凌,等.电导率法监测红豆杉细胞的生长[J].华中理工大学学报,2000,28(10):108-110.
- [12] 李新明,候嵩生,陈士云,等.植物细胞生长与培养液电导率及过氧化氢酶活性的关系[J].生物工程学报,1993,9(1):93-95.
- [13] 陈士云,候嵩生,叶和春,等.外循环气升式反应器培养新疆紫草细胞[J].生物工程学报,1994,10(1):81-86.
- [14] 王东,李启任,王建华,等.粉叶小壁细胞的悬浮培养及某些相关的生理生化特征[J].植物生理学通讯,1997,33(2):91-94.
- [15] 梅兴国,鲁明波,余江龙,等.红豆杉悬浮培养及动力学研究[J].华中理工大学学报,1997,25(2):104-106.
- [16] 阮茜,郭勇.磷限制培养中玫瑰茄细胞生长及花青素形成动力学[J].华南理工大学学报(自然科学版),1999,27(1):86-90.
- [17] 候学文,郭勇.不同氮源对悬浮细胞玫瑰茄细胞生长及硝态氮同化指征的影[J].广西植物,1998,18(2):169-172.
- [18] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996.52~54.
- [19] 周云龙.植物生物学[M].北京:高等教育出版社(第一版),1999.273-274.

The effect of the different hormones on the growth and the consuming of nutrition elements of the starwort cell

DENG Guang-cun, PENG li, YANG Cai-rong, WU Xiao-ling
(Life Science School, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The effects of different hormone treatments on the growth and metabolizing of the starwort cell nutrition were studied. The results showed that the numbers, the dry weight and the fresh weight of starwort cells treated with M₄(MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L) medium were the highest on the 16 th day, while the content of sugar was the lowest. Moreover, electronic leakage of M₄ treatment was the highest during the culture period. The content of phosphor which used up to 60% from 0~4 day in mediums was the key factor of starwort cell growth, while starwort cell absorbed nitrate nitrogen mostly after 4 days.

Keywords: starwort; cell suspension culture; metabolizing kinetics