

黄豆芽愈伤组织培养条件对 Vc 积累的影响

张恒 (淮阴工学院生化学院, 江苏淮安 223001)

摘要 优化了黄豆芽愈伤组织培养条件,建立了合适的黄豆芽细胞悬浮培养体系。以在 25℃ 无激素条件下自然生长的豆芽子叶、叶芽、芽茎、芽根等部位为外植体诱导愈伤组织,以次生代谢产物 Vc 积累最多为目标,考察外植体、基础培养基、萘乙酸(NAA)浓度以及 pH 值的影响。结果表明:叶芽在 pH 值为 5.0 的 B₅ 培养基中,能有效诱导愈伤组织,且目标产物 Vc 积累最多。低浓度 NAA 对黄豆芽愈伤组织诱导及次生代谢产物 Vc 积累影响不大,随浓度增加,影响加大。

关键词 黄豆芽;愈伤组织;悬浮培养;Vc

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)09-1828-02

Effect of Culture Condition of Soybean Sprout Callus on Accumulation of Vitamin C

ZHANG Heng (Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223001)

Abstract The culture condition of soybean sprout callus were optimized and the system of suspension of soybean sprout cell was set up. Under the condition of hormone-free at 25℃, the callus were induced with the cotyledon, leaf bud, bud stem and bud root from bean sprout which grew naturally. Based on the most accumulation of secondary metabolites Vitamin C as an object, the effect of explants, basal medium, concentration of NAA and pH on Vc accumulation were compared. The result showed that the callus could be effectively induced from the leaf bud cell of soybean sprout cultured in B₅ medium at pH 5.0 and the production of Vc was most. NAA in lower concentration little affected the induction of the callus of soybean sprout and the accumulation of the secondary metabolites Vitamin C, but the effect was increased as the increasing of NAA concentration.

Key words Soybean sprout; Callus; Suspension culture; Vitamin C

黄豆芽是常见的食物,虽源自黄豆,但营养价值却高于黄豆。在黄豆浸泡出芽过程中,豆内蛋白质和淀粉等生物大分子在天然酶催化下水解成氨基酸、短肽、单糖以及低聚糖等,营养成分更易被人体吸收。黄豆芽还含有钙、铁等矿物质及维生素,与黄豆籽粒不同的是,豆芽中的 Vc 含量极高。笔者以 Vc 积累最多为目标,对黄豆芽愈伤组织培养条件进行了优化。

1 材料与方

1.1 材料 自制黄豆芽。市售黄豆在 25℃ 无激素条件下,分别经清水、70%酒精溶液、2%次氯酸钠溶液、无菌水处理,在遮光、保湿的环境中,萌发至胚轴长 7~8 cm、子叶未展开时,收获。

1.2 仪器和试剂 LDZX 自动立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);DHZ-C 大容量恒温振荡器(江苏太仓市利科实验仪器厂);HH-6 数显恒温水浴锅(金坛市富华电器有限公司);可调万用电炉(上海联营通州市申通电热器厂);AY120 上皿电子天平(上海精科天平);SW-CJ-2F 无菌操作台(苏净集团安泰公司)。所用试剂均为分析纯。

1.3 外植体的选择及愈伤组织诱导 选用芽根、芽茎、子叶、叶芽等不同部位作为愈伤组织的外植体,对各部分次生代谢目标产物量进行比较。各部位分别切成约 1~2 cm 的条段,经无菌水、70%酒精溶液、2%次氯酸钠溶液处理,在无菌条件下接种于诱导培养基上^[1-5]。

1.4 基础培养基及培养条件的优化 分别选用 E₁、B₅、NN、L₂ 培养基附加不同浓度的 NAA,以正交试验法(表 1)确定最佳培养条件^[1-5]。

1.5 细胞培养方法 采用液体悬浮培养法(在 28℃, 150 r/min 的条件下,振荡悬浮培养)。

1.6 Vc 含量的测定 采用 2,6-二氯酚靛酚法。

1.7 诱导率与生长率计算^[6,7] 愈伤组织诱导率(%) = 产

表 1 正交试验的因素与水平

水平	培养基(A)	pH 值(B)	外植体(C)	NAA(D)//mg/L
1	B ₅	5.0	子叶	0
2	E ₁	5.4	叶芽	0.02
3	NN	5.8	芽茎	0.04
4	L ₂	6.2	芽根	0.08

愈伤组织的个数/接种外植体个数 × 100; 生长率(%) = (收获愈伤组织的鲜重 - 接种愈伤组织鲜重)/接种愈伤组织鲜重 × 100。

2 结果与分析

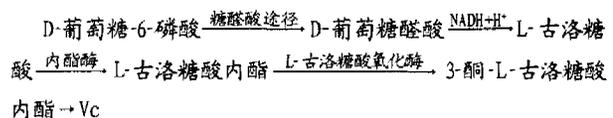
2.1 黄豆芽愈伤组织特征 在一定条件下离体的外植体可以形成愈伤组织,其形成过程是细胞的脱分化过程。一般认为诱发愈伤组织成败的关键在于培养条件。外植体上损伤的细胞能释放一种自溶产物,对诱导细胞的分裂起着重要作用。培养基中还必需加入一些生长调节物质,才能使已经分化后静止的细胞恢复分裂、脱分化和生产愈伤组织。松脆的愈伤组织是进行悬浮培养最为合适的材料,经机械振荡容易分散成单细胞和小细胞团。应选择生长旺盛且结构疏松的愈伤组织作为继代培养的种子。愈伤组织能否成功诱导,在植物细胞培养中占据重要地位。

由表 2 可见,以黄豆芽的子叶、叶芽、芽根、芽茎为外植体,在合适的培养基上均能诱导出愈伤组织,但不同部位被诱导产生愈伤组织的能力不同,其中叶芽的诱导频率很高。

表 2 不同外植体的愈伤组织特征

外植体类型	愈伤组织特征	外植体类型	愈伤组织特征
子叶	乳白色,疏松	叶芽	黄色,疏松
芽茎	乳白色,疏松	芽根	淡黄,较疏松

2.2 Vc 的生物合成途径 Vc 广泛分布于自然界,其生物合成途径如下^[8,9]:



作者简介 张恒(1958-),女,江苏南京人,硕士,教授,从事应用生物化学研究。

收稿日期 2006-02-13

黄豆籽粒中不含 Vc, 发芽后 Vc 含量迅速增加。由于黄豆含糖量比较少, 种子发芽时所需的碳源、氢源、氮源及能源主要来自于自身含有的脂肪、蛋白质等营养物质的氧化分解。这些物质通过糖异生作用形成葡萄糖-6-磷酸(G6P), 为 Vc 生物合成提供原料, 进而由糖醛酸途径形成葡萄糖醛酸。依据代谢调控理论, 凡是对糖异生作用、糖醛酸途径有影响的因素, 如营养素、pH 值及激素等都会影响酶的活性, 从而影响葡萄糖醛酸及后续代谢物的形成, 使 Vc 的积累即合成发生改变。

由于人类和其他灵长类等少部分动物肝脏中缺少 L-古洛糖酸- γ -内酯氧化酶, 不能合成 Vc, 必须从食物特别是植物性食物中获得。

2.3 培养时间与 Vc 含量的变化 目标产物量随培养时间变化而变化。选择 L₂ 培养基, 添加 0.02 mg/L NAA, pH 值 5.0, 28 °C 诱导愈伤组织, 跟踪检测 Vc 含量。结果显示, 培养过程中 Vc 含量达到最大的时段在 108 h 左右, 随后则呈下降趋势(图 1)。

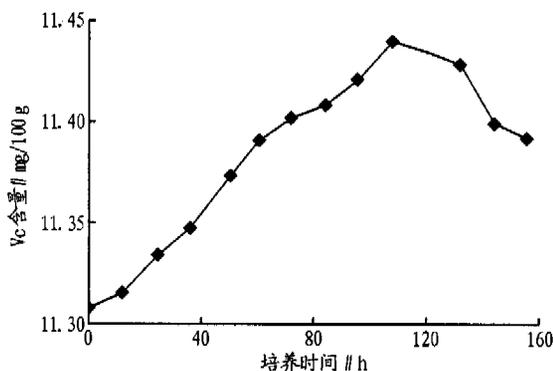


图 1 培养时间与 Vc 含量变化

2.4 培养条件优化 由于单从愈伤组织外观无法准确判断次生代谢目标产物产量高低, 为了考察不同外植体愈伤组织与目标产物的关系, 以培养基种类、pH 值、外植体类型(豆芽部位)以及附加物 NAA 浓度为考察因素, 按照正交表 L₁₆(4⁵) 的组合进行优化试验, 培养各外植体愈伤组织。最初 2 d 每 12 h, 以后每 10 h 跟踪检测目标产物, 培养过程中 Vc 含量最高的时段集中在 80~130 h。以 Vc 含量最大值为考核指标(表 3), 依据数理统计原理进行数据处理, 得到黄豆芽愈伤组织培养条件的优化结果, 即在 NAA 浓度 0.08 mg/L、pH 值 5.0 的 B₅ 培养基中, 叶芽组织产生的目标产物含量最高。

2.5 不同因素对目标产物积累的影响

2.5.1 外植体类型。 在被考核的 4 个因素中, 对目标产物 Vc 积累影响最明显的是外植体类型, 这从另一个侧面证明外植体愈伤组织诱导的重要性。

外植体是常见且时下易获得活体单元、便于培养、生长周期短, 是目标产物的高产植株。而目标产物实用性高, 在原料植株中含量丰富。试验植株黄豆芽富含 Vc, 四季皆可培养, 无时间与地域之别, 3~5 d 即可自然生长成形, 无需特殊条件。豆芽整株的 Vc 含量约为 9.87~10.08 mg/100 g。其中, 叶芽部分含量最高, 可达 11.3~11.5 mg/100 g; 其余部分的含量略有差别, 但基本都在 7~10 mg/100 g。在培养过程中, Vc 含量变化趋势为先增加后递减, 但叶芽部分的缩减量

最不明显。

表 3 正交试验 Vc 含量最大值 mg/100 g

试验号	Vc 含量	试验号	Vc 含量
1	10.831	9	11.458
2	11.456	10	10.847
3	6.148	11	6.147
4	10.757	12	10.782
5	10.772	13	10.844
6	6.145	14	11.436
7	11.440	15	6.141
8	10.832	16	10.832

2.5.2 培养基种类。 培养基的营养组成是影响细胞生长和产物合成的主要因素之一。试验中选用 E₁、B₅、NN、L₂ 4 种培养基, 对黄豆芽愈伤组织培养过程中培养基组成与目标产物关系进行考察, 以确定最适培养基。

由正交试验结果可知, 培养基的种类与组成对目标产物影响较大。4 种培养基的目标产物累积先后排序为: B₅ > L₂ > E₁ > NN。其中, B₅ 和 L₂ 2 种培养基目标产物量相当, 适合于黄豆芽愈伤组织生长, 而 NN 培养基目标产物量最小。这可能是因为 B₅ 培养基铵盐含量较少所致^[10-12]。

2.5.3 pH 值。 Vc 是含有 6 个碳原子的酸性多羟基化合物^[8]。由于其分子中第 2、3 位碳原子上的 2 个烯醇式羟基极易游离而释放出 H⁺, 故具有有机酸的性质。Vc 具有很强的还原性, 所以极易被氧化剂及热破坏, 在中性或碱性溶液中破坏尤其迅速。Vc 在酸性环境下较稳定, 由于植物细胞适宜的生长环境为偏酸性, 因此培养基的 pH 值应呈酸性。试验条件下以 pH 值 5.0 左右最为适宜。但酸度过大则会影响酶活性, 不仅使细胞的代谢及次生代谢产物的合成速度降低, 还可能使一部分组织受损。

2.5.4 生长素。 植物生长调节剂在离体植物细胞的分裂、分化以及根、芽形成中起着积极的作用, 培养基中含有的这些物质与愈伤组织的形成有关^[7-10]。但由图 2 可知, 试验范围内 NAA 浓度的改变对次生代谢产物 Vc 积累几乎没有影响, 这和代谢调控理论有一定距离, 可能是浓度梯度太小所致。选择 B₅ 和 L₂ 培养基, 分别附加 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 的 NAA, 于 28 °C 培养 140 h, 测定愈伤组织诱导率、生长率及 Vc 增长率。结果表明: 当 NAA 分别为 1.0 和 2.0 mg/L 时, B₅ 培养基中的 Vc 增长率分别是 L₂ 培养基的 2 和 1.5 倍。

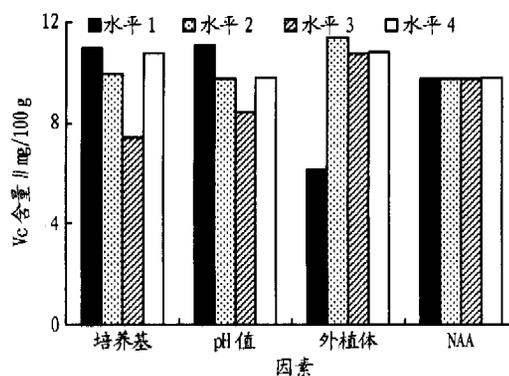


图 2 不同影响因素对 Vc 含量的影响

(下转第 1832 页)

能量和底物,进而促进萌发和提高种子的活力^[20]。

王磊等^[21]的研究结果也表明,在干旱条件下,钙+赤霉素混合浸种的种子在萌发过程中,可以使胚部保持比对照、单独 CaCl₂ 处理和单独 GA 处理都要低的氧化水平,从而促进种子萌发。

(3)适当时间的吸湿-回干处理能明显增强生物膜保护酶 SOD 和 CAT 的活性,从而有效缓解膜脂质过氧化作用和电解质渗漏,提高了呼吸强度,最终提高种子的活力^[22]。该试验结果表明:辣椒种子吸湿 24 h 后回干,能显著提高种子活力,加速胚根生长,这与前人在其他作物种子上的试验结果一致^[15,22-27]。预浸可能使劣变种子有机会修复自身在贮藏过程中发生的损伤,从而提高预浸种子的生活力^[6]。吸湿-回干的作用机理在于细胞膜结构的修复和代谢功能的激活^[2]。

参考文献

- [1] 孙艳,崔鸿文,李文平. 几种化学物质浸种对辣椒种子发芽力的影响[J]. 种子, 1995(5): 17-19.
- [2] 徐本美,王文铃,刘秀芝,等. 辣椒种子催芽剂的研究和应用[J]. 种子, 1995(6): 53-55.
- [3] 苏争艳,刘永庆,谭金莲,等. 辣椒种子结构与生活力关系的研究[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(2): 139-142.
- [4] 宋松泉,傅家瑞. 钙对种子萌发的调节作用[J]. 种子, 1991(5): 34-37.
- [5] 宋志荣. 几种药剂对辣椒种子发芽的影响研究[J]. 中国种业, 2003(6): 26-27.
- [6] 刘永庆,余祥明. 预浸处理对辣椒种子生活力与活力的影响[J]. 中国蔬菜, 1995(4): 7-10.
- [7] 吴才君,范淑英,罗赣丰. 辣椒种子活力保持和提高的研究[J]. 江西农业大学学报, 1999(4): 505-508.
- [8] 邹礼平,黄竹芹. 磁场条件下赤霉素对辣椒种子萌发及成苗的影响[J]. 长江蔬菜, 2001(1): 30-31.
- [9] 程大友,张义,陈丽. 氯化钠胁迫下甜菜种子的萌发[J]. 中国糖料, 1996(2): 21-23.
- [10] 谢德意,王惠萍,王付欣,等. 盐胁迫对棉花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 中国棉花, 2000, 27(9): 12-13.
- [11] 卢静君,李强,多立安. 盐胁迫对金牌美达丽和猎狗种子萌发的影响[J]. 植物研究, 2002, 22(3): 328-332.
- [12] 王庆亚,刘敏,张守栋,等. 盐胁迫对盐草种子萌发与幼苗生长效应的研究[J]. 江苏农业科学, 2002(2): 69-71.
- [13] 梁云媚,李燕,多立安,等. 不同盐分胁迫对苜蓿种子萌发的影响[J]. 草业科学, 1998, 15(6): 21-25.
- [14] 安守芹,于卓,孙丽娟,等. 花棒等四种豆科植物种子萌发及苗期耐盐性的研究[J]. 中国草地, 1995(6): 29-32.
- [15] 贺军民,余小平,张健. 番茄种子吸湿-回干处理对盐胁迫伤害的缓解效应[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 123-126.
- [16] 陈士林,卫秀英,赵新亮. 赤霉素和钙对玉米种子萌发的效应[J]. 种子, 2004(4): 47-49.
- [17] 山仑,郭礼坤,徐萌,等. 干旱条件下钙和赤霉素混合处理种子的生理效应及增产效果[J]. 干旱地区农业研究, 1994(1): 85-90.
- [18] 郭礼坤. 钙和赤霉素合剂处理种子的抗旱增产效果及原理[J]. 水土保持研究, 1998(1): 79-87.
- [19] 宋淑明. 钙、赤霉素对小冠花种子萌发的效应[J]. 草业科学, 1997(3): 46-48.
- [20] 陈士林,王春虎. 钙和赤霉素对棉花种子发芽力及活力的影响[J]. 中国农学通报, 2004(3): 112-113.
- [21] 王磊,张彤,杨君兴,等. 干旱条件下钙和赤霉素混合处理小麦种子对胚部抗氧化酶活性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(1): 125-128.
- [22] 贺军民,余小平. 提高人工老化番茄种子活力的研究[J]. 西北大学学报, 2000, 30(2): 147-149.
- [23] 谷建田,孔祥辉,陈杭. 番茄种子人工老化前后吸湿-回干处理的生理生化变化[J]. 植物生理学报, 1993, 19(2): 131-136.
- [24] 刘岩,陈杭,郑光华,等. 吸湿-回干处理对大豆种子抗吸胀冷害的生理效应[J]. 植物学报, 1991, 33(3): 219-225.
- [25] 李先恩,陈震,赵杨景. 吸湿回干处理对干草种子萌发的作用[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(1): 13-15.
- [26] 朱志梅,朱炳煜. 吸湿回干处理对小麦抗盐性的生理效应[J]. 内蒙古大学学报, 2003, 34(4): 429-431.
- [27] 余小平,贺军民. 吸湿-回干处理降低番茄种子电解质渗漏的机理研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(1): 41-46.

(上接第 1829 页)

由图 2、3 及相关试验结果可知,低浓度 NAA 对黄豆芽愈伤组织诱导及次生代谢产物积累影响不大,随着 NAA 浓度增大,影响显著增加,在 B₅ 和 L₂ 2 种培养基上,黄豆芽愈伤组织的诱导率和生长率均呈上升趋势,但 B₅ 培养基增加趋势略强于 L₂ 培养基,说明 B₅ 培养基更适合于黄豆芽愈伤组织的生长和诱导。

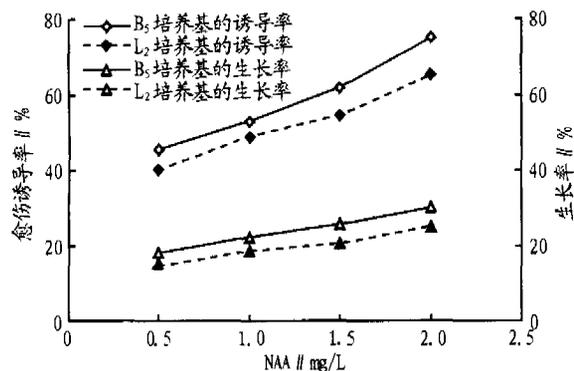


图 3 不同浓度 NAA 对愈伤组织诱导率及生长率的影响

3 结论

(1)黄豆芽愈伤组织最适培养条件是:以叶芽作为外植体,在 B₅ 培养基附加 NAA 1.0 mg/L, pH 值 5.0~5.4, 28℃ 恒温条件下,培养 100~120 h。

(2)低浓度 NAA 对黄豆芽愈伤组织诱导及次生代谢产物 Vc 积累影响不大,但随浓度增加,影响加大。

参考文献

- [1] HUANG S Y, CHOU C J. Effect of gaseous composition on cell growth and secondary metabolite production in suspension culture of stizolobium hassjoo cells[J]. Bioprocess Engineering, 2000, 23: 585-593.
- [2] 驹岭穆. 植物细胞培养与有用物质[M]. 东京:シーエムシー, 2000: 78-218.
- [3] KUCHUK N, HERRMANN R G, KOOP H U. Plant regeneration from leaf protoplasts of evening primrose (*Oenothera hookeri*) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 601-604.
- [4] ZHANG W, JIN M F, YU X J, et al. Enhanced anthocyanin production by repeated-batch culture of strawberry cells with medium shift[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55: 164-169.
- [5] CENGIZ YILMAZ, ESRA ERDEMLI, HAKAN SELEK, et al. The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2001, 121: 426-428.
- [6] 汤行春,刘幼琪. 连翘组织培养研究 I 愈伤组织的诱导与培养条件的优化[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2000, 22(2): 185-187.
- [7] 董诚明,许桂芳,周吉源,等. 植物生长调节剂对华黄氏愈伤组织诱导、增殖及芽分化的效应[J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 1994, 28(4): 529-532.
- [8] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学:上[M]. 北京:高等教育出版社, 2002: 461-464.
- [9] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学:下[M]. 北京:高等教育出版社, 2002: 63-158.
- [10] 李宝,韩振海. 落叶果树离体器官再生研究的现状和存在问题[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(1): 31-36.
- [11] 郭勇,崔堂兵,谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2004: 90-99.
- [12] 元英进. 植物细胞培养工程[M]. 北京:化学工业出版社, 2004: 24-106.