

磷对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的影响

Effect of Phosphate on Growth and Polysaccharide Production by Suspension Cultures of Protocorm-like Bodies of *Dendrobium huoshanense*

姜绍通* 魏 明 罗建平

JIANG Shao-Tong*, WEI Ming and LUO Jian-Ping

合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009

School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

摘 要 在确定了最适接种量和外植体细胞生理时间的基础上,研究了在不同起始磷浓度下,霍山石斛类原球茎生长、碳、氮消耗和多糖积累的动力学特性。以生长 30d 的类原球茎为材料,在接种量为 100g/L 时,类原球茎生长的最佳起始磷浓度为 2.5mmol/L,培养 36d 时,类原球茎鲜重达 496.5g/L。动力学分析表明,磷是霍山石斛类原球茎生长的限制性因素,胞内磷的积累水平与细胞生长具有相关性,2.5mmol/L 的磷酸盐有利于碳、氮等营养物质的吸收;而多糖积累的最佳起始磷浓度为 0.312mmol/L,培养 36 d 时,其产量为 2.22g/L。

关键词 霍山石斛,类原球茎,悬浮培养,起始磷浓度,多糖

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0613-06

Abstract The effect of inorganic phosphate on cell growth, accumulation of polysaccharides together with nutrient utilization was investigated in suspension cultures of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. Thirty-day-old cells were transferred into liquid medium with the inoculum density of 100g/L cells. The results indicate that the optimal concentration of phosphate in medium for cell growth of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense* was 2.5mmol/L and biomass was 496.5g/L (fresh weight). Phosphate was a limited factor for cell growth and there was relationship between the levels of intracellular phosphate and cell growth. 2.5mmol/L of medium phosphate was beneficial to the absorption of carbohydrate and nitrate source. 0.312mmol/L of medium phosphate was better for accumulation of polysaccharides and production of polysaccharides was 2.22 g/L at 36 d.

Key words *Dendrobium huoshanense*, protocorm-like bodies, suspension culture, initial phosphate concentrations, polysaccharides

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)属于兰科石斛属,产于安徽霍山及邻近地区,是名贵中草药,其含有活性多糖、生物碱等多

种化合物^[1,2],具有滋阴消热、生津益胃、润肺止咳等功效。现代药理研究证明,石斛多糖具有增强机体免疫功能^[3],显著提高机体杀伤肿瘤细胞的能力

Received: January 16, 2006; Accepted: March 3, 2006.

This work was supported by the grant from the Key Project for Science and Technology Research from Ministry of Education of China (No. 03098).

* Corresponding author. E-mail: jiangst@hfut.edu.cn

教育部科学技术研究重点项目 (No. 03098)

力^[4]。由于霍山石斛对生长条件要求十分苛刻,自然繁殖能力低,生长周期长,加上人工大量采集,野生资源已濒临灭绝。类原球茎是霍山石斛体细胞胚,可由植株的不同部位诱导产生,具有和植株同样的物质代谢和形态发育潜能^[5]。探索霍山石斛类原球茎悬浮培养技术,以组织培养物代替原药材或生产有关活性成分,是解决霍山石斛资源短缺的方法之一。影响类原球茎生长的因素很多,如温度、溶氧、培养基组分等。磷是构成核酸、磷脂、ATP的主要成分,在代谢产物合成和能量代谢中对细胞生长具有调节作用^[6],不同的植物对磷的需求是不同的^[7]。本文重点考察了不同起始磷浓度下,霍山石斛类原球茎生长、主要营养物质消耗和多糖积累的动力学特性,目的是把握类原球茎悬浮培养细胞生长和生理代谢的变化规律,为调控类原球茎生长和多糖合成奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

霍山石斛类原球茎由本实验室诱导保存,在无激素固体 MS^[8]培养基中继代培养,继代周期为 30d,生长培养基为改良的 MS 培养基,其中微量元素、有机元素减半,大量元素:KNO₃ 30mmol/L, MgSO₄·7H₂O 1.5mmol/L 和 CaCl₂·2H₂O 4.5mmol/L,蔗糖浓度为 3%。

1.2 类原球茎悬浮培养条件

取生长 30 d 的类原球茎接种于装有 60mL 液体培养基(pH 为 5.8)的 250mL 三角瓶中,接种量为 100g/L(鲜重),置于摇床上(110r/min),(25±2)°C 下悬浮培养。光照周期为 14h/d,日光灯,光强为 40 W/m²,磷的浓度分别取 0、0.312、0.625、1.25、2.5 和 5.0mmol/L,每隔 6d 随机取样 1 次,36d 收获类原球茎。做细胞生理时间试验时,分别取 20、30、40 和 50d 的类原球茎进行培养,做接种量试验时,接种量分别为 33.3、66.7、100、133.3、166.7g/L。

1.3 分析方法

培养结束后,收获类原球茎,用滤纸吸干类原球茎表面的水分后称重。提取多糖前,类原球茎先用蒸馏水洗 2 次,然后研碎用蒸馏水在 50~60°C 水浴上提取 3 次,收集水提液,加 95% 乙醇至 80% 浓度过夜沉淀,最后收集沉淀。沉淀溶于蒸馏水中用 Savage 法脱蛋白,并用苯酚-硫酸测定多糖^[9]。培养基中的多糖提取方法同上,培养基中的残糖用蒽酮-硫酸法测定^[10],磷酸根离子用磷钼蓝法测定^[11],硝

酸根离子用水杨酸-浓硫酸法测定^[12](考虑到培养过程中水分的蒸发对测定的影响,在测定培养基中的各种成分时,保持培养基的体积为接种时的体积)。

类原球茎生物量 = 收获类原球茎的总鲜重/接种时培养基体积(g/L),类原球茎的增值量 = 收获类原球茎的总鲜重 - 接种时类原球茎的重量。类原球茎生长速率 = 类原球茎鲜重增量/培养时间 [g/(L·d)],胞内多糖含量 = 胞内多糖产量/类原球茎鲜重(mg/g),多糖总产量为多糖总提取量(g/L),所有实验至少重复 2~3 次,实验数据以平均值附标准偏差表示。

2 结果

2.1 接种量和类原球茎细胞生理时间的确定

接种量的大小影响细胞的生长,细胞的生长需要一定的密度,当接种量低于某一临界值时,细胞就难以生长^[13]。另外,相对高的接种量是高密度培养所必需的。表 1 表明了接种量对霍山石斛类原球茎生长的影响。当接种量在 33.3~100g/L 之间时,类原球茎的增殖量和生长速率随着接种量的增大而增大,当接种量超过 133.3g/L 时,类原球茎的增殖量又开始下降,生长速率反而降低。尽管接种量小,比生长速率大,但类原球茎产率低,在相同的培养时间内,类原球茎的增殖量小,要达到最大细胞鲜重,时间会延长,从工业化角度来讲,培养周期的延长是非常不利的,而过大的接种量也不利于类原球茎的生长。综合考虑接种量对类原球茎培养的影响,接种量为 100g/L 最适合,以下实验均取接种量为 100g/L。

表 1 接种量对霍山石斛类原球茎生长的影响
Table 1 The effect of inoculum densities on growth of protocorm-like bodies of *D. huoshanense*

Inoculum densities/(g/L)	Increase in cell mass/(g/L)	μ/d^{-1}	Growth rate/[g/(L·d)]
33.3	178.4±1.6	0.050±0.001	6.8±0.08
66.7	344.6±9.2	0.048±0.003	9.6±0.20
100.0	365.0±3.6	0.042±0.001	10.2±0.12
133.3	337.4±3.2	0.035±0.001	9.3±0.10
166.7	305.0±6.2	0.029±0.002	8.5±0.18

细胞生理时间不同,其生理状态不同,良好的生理状态是保持细胞生长旺盛和代谢产物合成的基础^[14]。从表 2 可知,20~40d 的类原球茎可以保持良好的生长状态,其中 30d 为最好,类原球茎增殖量、生长速率,比生长速率均最大,所以用培养 30d 的类原球茎进行继代是比较理想的。

表 2 细胞生理时间对霍山石斛类原球茎生长的影响

Table 2 The effect of cell physiological time on growth of protocorm-like bodies of *D. huoshanense*

Cell physiological time/d	Increase in cell mass/(g/L)	μ/d^{-1}	Growth rate/[g(L·d)]
20	333.7 ± 6.7	0.039 ± 0.001	9.2 ± 0.07
30	363.3 ± 3.3	0.042 ± 0.001	10.1 ± 0.10
40	326.3 ± 2.0	0.039 ± 0.003	9.1 ± 0.42
50	280.1 ± 6.7	0.033 ± 0.002	7.8 ± 0.28

2.2 磷对霍山石斛类原球茎生长的影响

图 1 表示了磷对类原球茎生长的影响,不同磷浓度下,细胞生长都经过延滞期,且磷浓度越低,延滞期越长,在无磷的情况下,类原球茎的生长明显受到抑制。随着磷浓度的增大,生物量,细胞生长速率开始增大,当磷浓度增大到 5.0mmol/L 时,细胞生长速率不再增大;当磷浓度低于 0.625mmol/L 时,类原球茎生长缓慢,说明磷是霍山石斛类原球茎生长的限制性因素。由表 3 可知,起始磷酸盐的浓度为 2.5mmol/L 时,类原球茎的生长速率、生物量、细胞得率都最大,培养 36 d 时,鲜重为 496.5g/L。

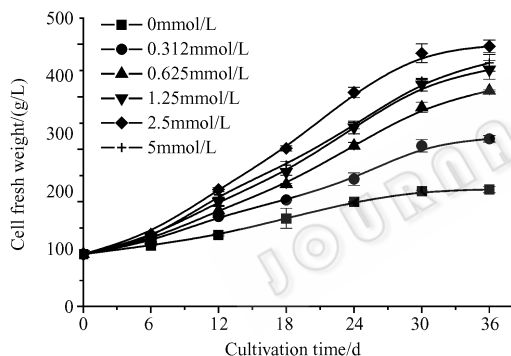


图 1 不同起始磷浓度下类原球茎生长动态

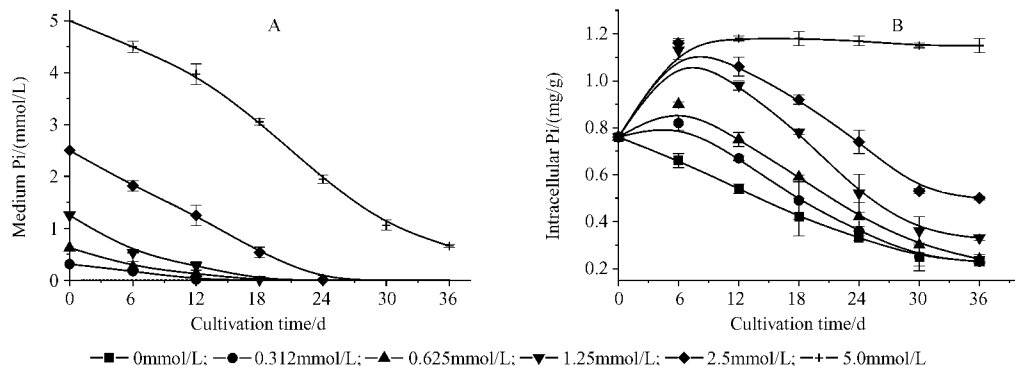
Fig. 1 Kinetics of growth in suspended cultures of protocorm-like bodies of *D. huoshanense* at different initial phosphate concentrations

图 2 培养过程中胞外磷(A)和胞内磷(B)的变化

Fig. 2 Kinetics of extracellular(A) and intracellular(B) phosphorus levels in suspended cultures of protocorm-like bodies of *D. huoshanense* at different initial phosphate concentrations

2.3 培养基中磷的消耗和胞内磷的积累

图 2 表示了不同起始磷浓度下,基质中磷的消耗和胞内磷的变化。不同起始浓度的磷酸盐在不同时间内被消耗,磷浓度在 0.312 ~ 2.5mmol/L 之间时,胞内磷的含量与基质中磷的浓度成正比,胞内游离磷的含量在培养 6d 后达最高,然后开始下降。磷在细胞内是分室存在的,其中 10% ~ 15% 构成核酸、磷脂、ATP 等结构性物质,而 85% ~ 90% 以磷酸根的形式存在于细胞质中供细胞的生理代谢所需^[6]。细胞内磷的积累水平对植物细胞生长及培养周期有重要的调节作用,不同的植物细胞,不同时期的细胞,胞内磷酸盐的积累水平不同^[7],而胞内磷水平的不同是引起细胞生理状态发生变化的重要原因。Curtis 等在研究罂粟细胞培养过程中发现,接种细胞中的磷积累水平的不同是导致不同批次罂粟细胞生长速率存在差异的重要原因^[15]。从不同磷浓度下胞内磷积累情况可以看出,类原球茎的生长与胞内磷的浓度有一定的关系。在培养初期,由于胞内磷快速增加,此时细胞迅速通过延滞期后快速生长。在细胞快速生长期,胞内磷维持在较高水平,而在细胞生长后期,随着胞内磷水平的下降,细胞生长趋缓。在一定范围内,胞内磷浓度越高,类原球茎生长越快,胞内磷浓度越低,类原球茎生长就越慢,当胞内磷的浓度低于一定水平时,类原球茎就停止生长。

2.4 胞外磷对碳、氮吸收的影响

图 3 表示了不同起始磷浓度下,培养基中主要营养物质碳、氮的消耗动态。磷对碳、氮的吸收和利用有很大影响^[16],在无磷的情况下,碳的利用率只有 47%、氮的利用率为 60%,随着磷浓度的增大,

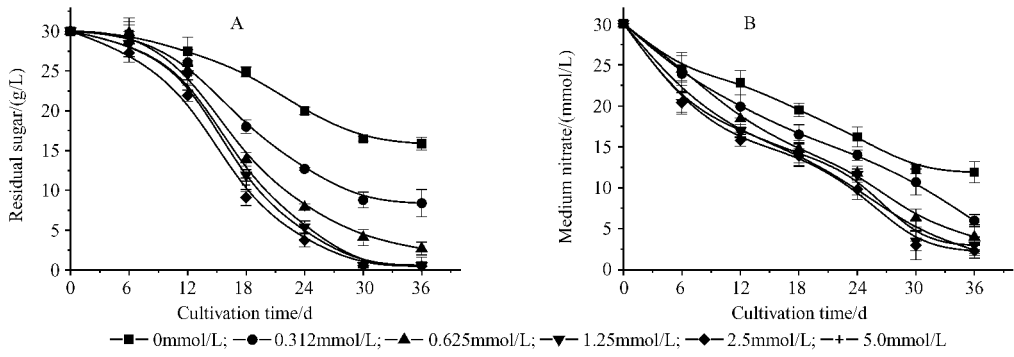


图3 不同起始磷浓度下碳(A)氮源(B)的消耗动态

Fig. 3 Kinetics of sugar(A) and nitrate(B) consumption in suspended cultures of protocorm-like bodies of *D. huoshanense* at different initial phosphate concentrations

碳、氮的利用速率也增大,而当磷浓度为 2.5mmol/L 时,碳、氮的利用率达 98%和 96%,并与细胞生长相对应,说明随着磷浓度的增大,细胞生长速度加快,胞外营养成分的吸收利用速率也提高。

2.5 磷对多糖合成的影响

图4、图5和图6描述了不同起始磷浓度下,细胞内多糖和基质中多糖含量及多糖产率的动态变化。在培养初期(0~24d),不同磷浓度下,随着类原球茎的生长,胞内和基质中的多糖含量以及多糖产率都不断增加,由此可知,多糖的合成是伴随着类原球茎的生长而进行的,多糖合成与类原球茎的生长相关。当培养到后期,多糖含量又都开始下降,这是由于在培养初期,细胞生长较快,多糖合成也相应加快,当进入培养后期时,细胞生长趋缓,多糖含量下降,这可能和培养基中碳源浓度的快速降低相关,因

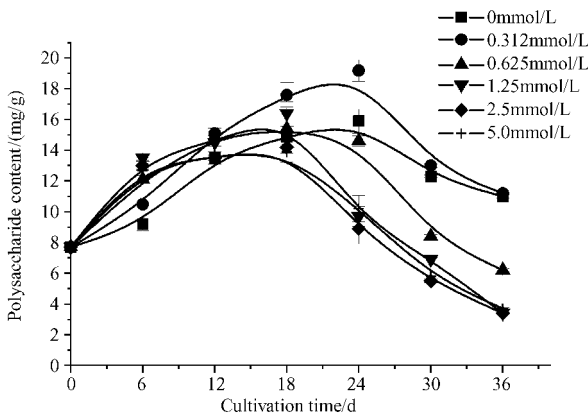


图4 不同起始磷浓度下胞内多糖含量的变化

Fig.4 Kinetics of accumulation of polysaccharides in cell in suspended cultures of protocorm-like bodies of *D. huoshanense* at different initial phosphate concentrations

为在培养初期时,培养基中的碳一方面供应细胞生长,另一方面多余的碳源用来合成多糖,而当进入培

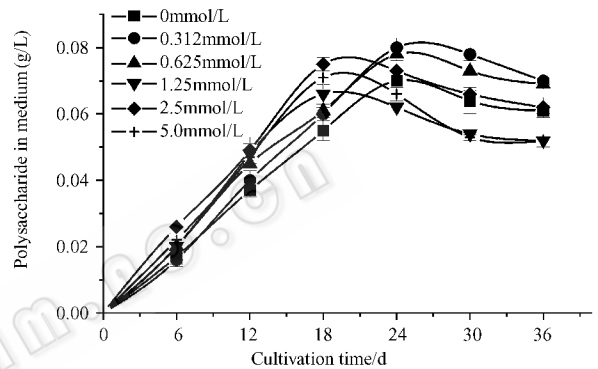


图5 不同起始磷浓度下培养基中多糖含量的变化

Fig. 5 Kinetics of polysaccharides content in medium in suspended cultures of protocorm-like bodies of *D. huoshanense* at different initial phosphate concentrations

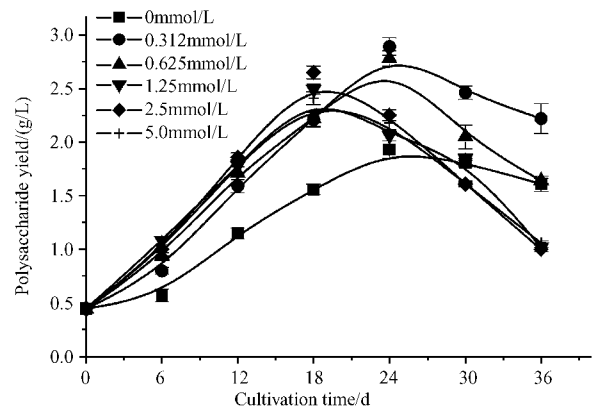


图6 不同起始磷浓度下类原球茎培养过程中多糖产率变化

Fig. 6 Kinetics of polysaccharides yield in suspended cultures of protocorm-like bodies of *D. huoshanense* at different initial phosphate concentrations

养后期时,培养基中的碳源被耗尽,胞内可溶性单糖得不到补充,此时胞内多糖开始降解,提供碳源维持细胞后续生长。由图6和表3可知,磷浓度为 2.5mmol/L 时,多糖收获在 18d 最佳,培养 36d 时,多

糖产量最低,多糖的得率系数 $Y_{p/s}$ 也最小,磷浓度在 0.312mmol/L 时,多糖收获在 24d 最佳,培养 36d 时,多糖产量较高,多糖的得率系数 $Y_{p/s}$ 较大。因为在磷浓度为 2.5mmol/L 时,类原球茎生长较快,需要大量碳源供给细胞生长,碳源消耗也快,到培养后期时,培养基中的碳源被耗尽,没有足够的碳源来合成

多糖,相反胞内的多糖被快速降解,最终多糖的得率系数较小,而磷浓度为 0.312mmol/L 时,类原球茎生长较慢,碳源消耗也较慢,因而有足够的碳源来合成多糖,同时胞内多糖降解较慢,最终的多糖得率系数也较大。

表 3 磷对类原球茎生长和多糖合成的影响

Table 3 Effect of initial phosphate levels on cell growth and polysaccharide synthesis in suspended cultures of *D. huoshanense*

Pi(mmol/L)	μ/d^{-1}	Growth rate [g(L·d)]	Y_{CS}	Utilization/%		$Y_{P/S}$
				C	NO ₃ -N	
0.000	0.020 ± 0.001	3.2 ± 0.14	0.49 ± 0.02	56 ± 0.04	60 ± 0.02	0.109 ± 0.002
0.312	0.028 ± 0.001	5.2 ± 0.10	0.59 ± 0.01	80 ± 0.05	79 ± 0.06	0.122 ± 0.001
0.625	0.034 ± 0.002	7.7 ± 0.34	0.67 ± 0.01	94 ± 0.01	89 ± 0.04	0.070 ± 0.004
1.250	0.037 ± 0.001	9.0 ± 0.32	0.77 ± 0.03	99 ± 0.06	93 ± 0.03	0.032 ± 0.002
2.500	0.039 ± 0.001	9.3 ± 0.42	0.79 ± 0.02	99 ± 0.01	96 ± 0.02	0.031 ± 0.003
5.000	0.037 ± 0.001	9.0 ± 0.15	0.77 ± 0.01	98 ± 0.02	93 ± 0.01	0.034 ± 0.001

3 讨论

通过以上研究可知,磷对霍山石斛类原球茎生长和多糖合成有显著的影响,当起始磷酸盐浓度为 2.5mmol/L 时,类原球茎生长最快,其生物量也最大,但不利于多糖的积累,而当起始磷酸盐浓度为 0.312mmol/L 时,最有利于多糖的积累,其多糖产量最高,但不利于细胞生长。胞内磷的积累水平与类原球茎的生长相关,胞内磷的积累水平越高,细胞生长越快,反之越慢。多糖是初级代谢产物,与次级代谢产物有很大不同,多糖合成主要在细胞生长的初期,而后多糖含量开始下降。原因是培养基中碳源在培养后期被耗尽,使类原球茎合成多糖时无足够的碳源来维持^[17]。多糖作为一种能源储备物质,在缺乏碳源时会被分解为单糖,以解能量燃眉之需,所以当培养基中的碳源被耗尽时,多糖就被分解为单糖,以供细胞生长和其它生理代谢之用^[18]。多糖的合成不仅与类原球茎的生长有关,而且与培养基中碳、磷浓度有关。在 2.5mmol/L 磷浓度下,类原球茎生长快,培养周期短,生物量最大,培养基中的碳、氮等营养物质消耗快,利用率高,使流向合成多糖的碳源减少,最终多糖产量低,即 $Y_{p/s}$ 小;在 0.312mmol/L 磷浓度下,类原球茎生长慢,最终生物量小,碳、氮等营养物质消耗慢,利用率也低,培养基中有足够的碳源合成多糖,虽然单位时间内多糖合成少,但最终多糖产量最高,即 $Y_{p/s}$ 大。由此可知,磷可以调节类原球茎的生长和多糖的积累,通过调节培养基中磷酸盐的浓度来调节碳、氮等营养物质的利用以及碳源

的流向并控制细胞生长和多糖合成。相对高的生物量是获得高多糖产量的基础,所以可以在较高磷浓度下获得较大的生物量,然后调控磷的浓度,使类原球茎生长和多糖合成协调进行,以期达到最大多糖产量。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Chen XM(陈晓梅), Guo SX(郭顺星). Study progress of the *Dendrobium* plants in chemicals constituents and pharmaceutical activity. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 2001, **13**(1):70-74
- [2] Bi ZM, Wang ZT, Xu LS. Chemical constituents of *Dendrobium monili forme*. *Acta Botanica Sinica*, 2004 **46**(1):124-126
- [3] Huang MQ(黄民权), Cai TY(蔡体育), Liu QL(刘庆伦). Effects of polysaccharides from *Dendrobium candidum* on white blood cells and lymph cells moving inhibition factory of mice. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 1996, **8**:39-41
- [4] Luo H(罗慧伦), Cai TY(蔡体育), Chen Q(陈巧伦) et al. Enhancement of *Dendrobium candidum* polysaccharide on killing effect of LAK cells of umbilical cord blood and peripheral blood of cancer patients *in vitro*. *Cancer*(癌症), 2000, **19**(12):1124-1126
- [5] Huang MQ(黄民权), Lu YJ(卢应京). Prospect on cultures of *Dendrobium candidum* used as drugs. *J Chin Med Mater*(中药材), 1998, **21**(11):543-545
- [6] Bramble JL, Graves DJ, Brodelius P. Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production in *Coffea arabica*: Experimental results and mathematical model. *Biotechnology & Bioengineering*, 1991, **37**:859-868
- [7] Liu S, Zhong JJ. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and

- [8] Murashige T , Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* , 1962 , **15** :473 - 479
- [9] Zhong JJ , Wang DJ. Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng* : Cu⁺ effect. *J Biotechnol* , 1996 , **46** :69 - 72
- [10] Zhang ZL(张志良). Experiment Guide of Plant Physiology. Beijing :Higher Education Press(高等教育出版社),1993
- [11] Li WA(李文安), Luo SW(罗士伟). Cultivation Technology of Plant Tissue and Cell. Beijing : Science Press(科学出版社), 1988
- [12] Hecht U , Mohr H. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard seedlings. *Physiol Plant* ,1990 ,**78** :379 - 387
- [13] Zhang YH , Zhong JJ. Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme and Microbial Technology* , 1997 , **21** :59 - 63
- [14] Atanas PG , Petia K. Relationship between type and age of the inoculum cultures and betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* hairy root culture. *Biotechnology Letters* , 2003 **25** :307 - 309
- [15] Curtis WR , Hasegawa PM , Emery AH. Modeling linear and variable growth in phosphate limited suspension culture of *Opium poppy*. *Biotechnology & Bioengineering* , 1991 , **38** :371 - 379
- [16] Abu SFQ , Sors TG , Cunningham SM *et al.* Phosphate nutrition effects on growth , phosphate transporter transcript levels and physiology of alfalfa cells. *Plant Cell ,Tissue and Organ Culture* , 2005 , **82** :131 - 140
- [17] Glicklis R , Mills D , Sitton D *et al.* Polysaccharide production by plant cells in suspension : Experiments and mathematical modeling. *Biotechnology & Bioengineering* , 1998 , **57** (6) :732 - 740
- [18] Han J , Zhong JJ. High density cell culture of *Panax notoginseng* for production of ginseng saponin and polysaccharide in airlift bioreactor. *Biotechnology Letters* , 2002 , **24** :1927 - 1930