

不同氮源对悬浮培养玫瑰茄细胞的生长及 硝态氮同化指征的影响*

侯学文 郭 勇

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

摘 要 本文通过改变培养基中的氮源组成, 来研究氮源的变化对悬浮培养玫瑰茄细胞的生长及硝态氮同化指征(活体内硝酸还原酶活力)的影响。实验表明, 仅在含 NO_3^- 的培养基中能检测到硝酸还原酶活力, 而仅含 NH_4^+ 的配方不能检测到该酶活力, 表明硝酸还原酶是底物诱导酶。还探讨了培养基中不同的氮源组成对细胞生物量及pH的影响。

关键词 氮源; 悬浮培养; 玫瑰茄; 硝酸还原酶

The effect of various nitrogen sources on the growth and nitrate assimilation indicator of suspension roselle cell

Hou Xuewen Guo yong

(Department of Bioengineering, South-China University of Technology, Guangzhou, 510641)

Abstract The growth and nitrate assimilation of suspension roselle cell were studied through changing the nitrogen source of B₅medium. The nitrate assimilatory ability of suspension roselle cell was represented by nitrate reductase activity *in vivo*. The nitrate reductase activity could only be detected in the medium which had nitrate in it, but in the medium which used ammonium as only nitrogen source, the nitrate reductase activity could not be detected. So the nitrate reductase was verified again as substrate-inducing enzyme in cell culturing level. The nitrogen source also had obvious effects on the biomass and pH of the medium.

Key words Nitrogen source; suspension culture; roselle; nitrate reductase

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), 或称山茄 (roselle), 属于锦葵科木槿属, 为一年生直立草本植物。原产于非洲, 现广泛分布于热带、亚热带地区。玫瑰茄由于具有较高的经济价值, 于1910~1945年间引入福建省, 现我国广东、广西、云南等气候相宜的省区均有栽培。本实验室从玫瑰茄花萼中诱导出两种细胞系, 一株呈红色, 产生花青素; 一株呈白色, 该细胞系分散

* 1997-10-14 收稿

第一作者简介: 侯学文, 男, 1969年出生, 博士生, 生物学专业。

度高,生长快,故选择该细胞系为实验材料。

硝酸还原酶是植物细胞同化 NO_3^- 的限速酶,在 NAD(P)H 的辅助下,它催化 NO_3^- 还原成 NO_2^- [1]。植物细胞同化 NO_3^- 的能力,在活体细胞内将受到 NO_3^- 、 NAD(P)H 、硝酸还原酶三种因素的直接制约,因此利用活体法测定硝酸还原酶活力比体外测定法更能真实地反映出植物细胞同化 NO_3^- 的能力。在整体植株上,氮源对植株的生长及硝态氮同化能力的影响有不少的报道 [2],但直接利用细胞悬浮培养来研究二者之间的关系则较少见于文献报道。本文采用悬浮培养玫瑰茄细胞来进行此项研究。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养条件

选用本实验室多年驯化的玫瑰茄白色细胞系为材料。先将固体培养基上的愈伤组织转入 1 000 ml 的三角瓶(含 400 ml B_5 培养基)制作种子瓶。然后在液体培养基中传代用 1~2 次,使细胞分散良好,以保证供试材料均匀一致。试验采用 100 ml 的三角瓶,装液量为 50 ml,培养液 pH 调至 5.8,分装后经 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min,接种量为 1.5 g 鲜细胞每瓶。采用三种不同的配方: A. 正常 B_5 培养基; B. 去除 NH_4^+ 之 B_5 培养基; C. 去除 NO_3^- 之 B_5 培养基,蔗糖浓度为 3%,植物生长调节剂为 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 与 2.3 $\mu\text{mol/L}$ Kt,摇床转速 130 rpm,培养周期为 14 d,每 2 d 取样测定。

1.2 培养液 pH 值的测定

采用雷磁 pH S-25 酸度计,使用前经标准试剂校准。

1.3 生物量的测定

取样后用布氏漏斗抽滤,在万分之一的光电分析天平上称重,此定为鲜重。

1.4 培养液 NO_3^- 的测定

按照 Cataldo *et al* [3] 的方法进行。

1.5 培养液 NH_4^+ 的测定

参照 Ursula Hecht 等 [4] 的方法进行。

1.6 硝酸还原酶活力的体内测定

参照 Baer 等 [5] 的方法,并经改进:用布氏漏斗抽滤细胞时,用蒸馏水洗涤细胞数次以除尽残余培养液,将蒸馏水抽尽。称取 0.5 g 鲜细胞三份并放入 50 ml 三角瓶中,一份加入 5 ml pH 7.5, 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液和 5 ml 蒸馏水,作为空白对照;另两份各加入 5 ml pH 7.5, 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液和 5 ml 0.2 mol/L 的 KNO_3 溶液。将细胞摇匀,在黑暗中 30 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 30 min,离心除去细胞,取上清液 1 ml,加入 2 ml 磺胺(1%浓度,3N 盐酸配制)和 2 ml α -萘胺(0.02%浓度,0.3N 盐酸配制),混匀后于 30 $^\circ\text{C}$ 水浴中静置保温 30 min,立即于 520 nm 下测定光吸收。玫瑰茄细胞同化 NO_3^- 的能力以每小时每克鲜细胞产生的 NO_2^- 微摩尔数表示。

2 实验结果与讨论

2.1 不同氮源下玫瑰茄细胞培养过程中 pH 的变化

由实验结果可以看出,不同氮源的配方对培养液的 pH 有相当大的影响,见图 1。仅含 NH_4^+ 的 C 配方 pH (4.2~4.7) 偏低,而 A、B 两种配方 pH (5.2~5.9) 大体相似。这是因为 B_5 培养基中 NH_4^+ 由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提供,而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是生理酸性盐,随着 NH_4^+ 的消耗,必然伴随着培养

液 pH 值的降低; KNO_3 是生理碱性盐, 随着 NO_3^- 的消耗就会导致培养液 pH 值的升高。这就是采用 KNO_3 作为氮源的 A、B 两种配方比以 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源的 C 配方, 在整个培养过程中, 前二者的 pH 超过后者 1 个单位的主要原因。仅用 KNO_3 作为氮源的 B 配方比正常 B_5 培养基的 A 配方 pH 略微偏高, 基于上述的理由也可予以解释。虽然上述三种配方在培养过程中 pH 的不尽相同, 但它们的变化趋势却相同, 这表明了细胞本身对外界环境 pH 的调节作用, 这可能是通过细胞代谢过程中产生的 CO_2 、有机酸、质子梯度及其它代谢产物来完成的。

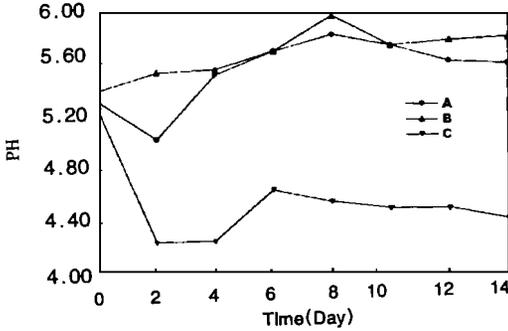


图 1 不同氮源下玫瑰茄细胞培养过程中 pH 的变化
Fig. 1 The pH changes in the cell-culture of roselle with different nitrogen sources

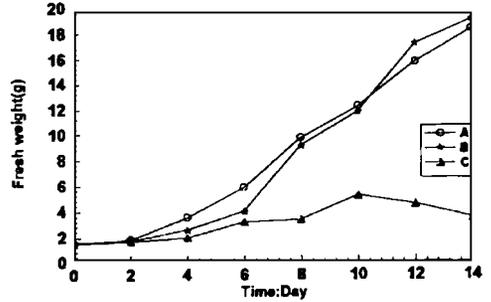


图 2 不同氮源下玫瑰茄细胞生长曲线
Fig. 2 Growth curve of roselle cell in different nitrogen sources

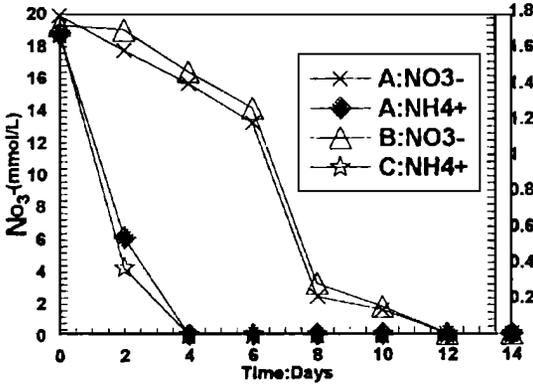


图 3 玫瑰茄细胞对不同氮源的同化曲线
Fig. 3 Assimilation curve of roselle cell in different nitrogen sources

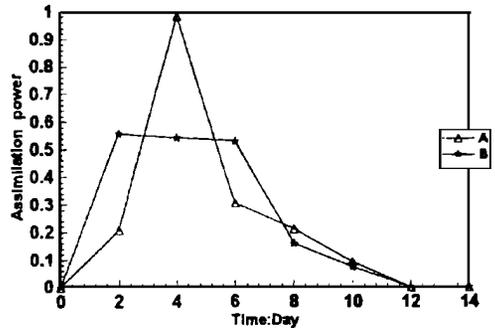


图 4 不同氮源下, 玫瑰茄细胞同化 NO_3^- 的能力
Fig. 4 Assimilative ability to NO_3^- of roselle cell in different nitrogen sources

2. 2 不同氮源下玫瑰茄细胞的生长曲线

实验结果表明, A、B 两种配方能够获得大致相同的生物量, 只是 A 配方生长启动速度较 B 配方稍快, 这反映出恰当的 NO_3^-/NH_4^+ 对比对细胞的生长是较为有利的。而仅以 NH_4^+ 为唯一氮源的 C 配方, 其所获得的生物量就远低于 A、B 两种配方, 仅相当于后二者的 25% (图 2)。石正强⁽⁶⁾认为, NH_4^+ 之所以不如 NO_3^- 高效, 主要是因为 NH_4^+ 启动了植物细胞不产生 ATP 的抗氰呼吸途径。

2.3 氮源的消耗曲线

由于胞外过量的 NH_4^+ 对细胞有毒害作用, 它必须具有较快的消除机制, 实验结果也证明了这一点, NH_4^+ 在 4 天之内即被消除完毕, 全部转入胞内以有机氮的方式储存起来, 供细胞逐步利用。而植物细胞对 NO_3^- 有较好的耐受能力, 因而消除速度较慢, 仅在此 6~8 d 之间 NO_3^- 出现较大程度的降低, 至 12 天后才消耗完毕 (图 3)。

2.4 不同氮源下, 悬浮培养玫瑰茄细胞的硝态氮同化指征: 硝酸还原酶的体内活力

实验表明, 硝酸还原酶是一严格的底物诱导酶, 只有在底物 NO_3^- 的存在下, 才能检测到硝酸还原酶的活力^[7]; 如果培养液中仅存在 NH_4^+ 则不会出现硝态氮的同化指征: 硝酸还原酶的活力。由于种子细胞是生长至 12~14 d 的种子瓶中, 此时 NO_3^- 已消耗完毕, 故刚从种子瓶中接出的细胞是检测不到硝酸还原酶的活力。前已述及, 采用活体法测定硝酸还原酶的活力更能真实地反映出植物细胞同化 NO_3^- 的能力。A 配方中细胞在利用 NH_4^+ 的同时, 也在同化 NO_3^- , 至第 4 天时硝酸还原酶的体内活力达到高峰, 此时刚好是 NH_4^+ 消耗完毕之时, 然后体内硝酸还原酶的活力逐渐降低, 这与培养液中 NO_3^- 的降低是有对应关系的; B 配方中仅有 NO_3^- , 细胞为了利用此唯一氮源, 一开始就诱导出较高的硝酸还原酶活力来同化 NO_3^- , 前 6 天同化能力维持在略降但较为恒定的水平, 直至第 8 天才出现较大幅度的降低, 这与培养液中 NO_3^- 的降幅是相一致的。C 配方中由于没有 NO_3^- , 故整个培养过程中均未检出硝酸还原酶的活力, 即没有同化 NO_3^- 的能力 (图 4)。

参考文献

- 1 Guerrero M G, Vega J M, Losada M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1981, **32**: 169~204
- 2 Sueyoshi K, Kleinhofs A, Wamer R L. Expression of NADH-specific and NAD(P)H-bi specific nitrate reductase gene in response to nitrate in barley. *Plant Physiol.*, 1995, **107**: 1303~1311
- 3 Cataldo D A, Hanson M, Schrader L E, et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Sci. Plant Anal.*, 1975, **6**: 71~80
- 4 Ursula H, Hans M. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. *Physiol. Plantarum*, 1990, **78**: 379~387
- 5 Baer G R, Collet G F. *In vivo* determination of parameters of nitrate utilization in wheat seedling grown with low concentration of nitrate in the nutrient solution. *Plant Physiol.*, 1981, **68**: 1237~1243
- 6 石正强. 铵态氮和硝态氮营养与大豆幼苗的抗氰呼吸作用. *植物生理学报*, 1997, **23** (2): 204~208
- 7 Somers D A, Kuo T M, Kleinhofs A, et al. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 1983, **72**: 949~952