

培养基对胡萝卜悬浮系茄红素合成代谢活性的影响

梁 燕¹ 陈大明^{2*} 王 鸣¹ 陈 杭²

(¹ 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; ² 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘 要: 以胡萝卜品种‘新透心红’稳定的细胞悬浮系为材料, 研究了基本培养基、蔗糖浓度和 PO_4^{3-} 浓度对其茄红素合成代谢活性的影响。结果表明, 在 B_5 、 MG_5 、ER 和 White 培养基中, MG_5 培养基最适宜于茄红素合成代谢, 细胞中茄红素含量显著高于其它培养基。以 MG_5 为基本培养基, 在 7 个蔗糖浓度处理中, $100.0 \sim 120.0 \text{ g L}^{-1}$ 范围内, 细胞中茄红素含量极显著高于其它处理, 茄红素合成代谢活性最高; 在 13 个 PO_4^{3-} 浓度处理中, $30.0 \sim 50.0 \text{ mmol L}^{-1}$ 范围内, 细胞中茄红素含量极显著高于其它处理, 茄红素合成效果最佳。

关键词: 胡萝卜; 培养基; 蔗糖浓度; PO_4^{3-} 浓度; 茄红素合成; 悬浮系

中图分类号: S 631.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0545-04

茄红素是由 8 个异戊二烯单位组成的具有线性对称结构的脂溶性萜类化合物, 具有极强的抗氧化活性, 对人类一些重要疾病以及癌症有显著的预防和治疗效果^[1]。然而, 天然的茄红素源很有限, 如何实现茄红素生产的规模化和工厂化就显得尤为迫切。

凡是植物细胞在离体条件下能够积累的次生物质都可以通过离体培养来生产, 而且这种生产途径是经济可行的^[2], 培养基体系对离体细胞次生物质的代谢活性和产量具有显著的影响^[3~9]。胡萝卜细胞作为生物反应器进行花青苷、醌类物质的合成与生产已有研究报道^[3~5]。本试验以胡萝卜为材料, 研究了培养基、蔗糖浓度和 PO_4^{3-} 浓度对离体细胞茄红素合成代谢活性的影响, 以期筛选出适宜茄红素合成的培养基体系。

1 材料与方法

1.1 细胞系的建立与保存

胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 试材‘新透心红’是陕西省选育的新品种, 经北京市农林科学院蔬菜研究中心测定, 其肉质根茄红素含量较高。

种子去毛, 1% AgNO_3 消毒 30 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 无菌滤纸吸干种子表面水分, $1/2 \text{ MS}$ 固体培养基, 26℃, 暗培养 7 d 后, 将无菌幼苗的下胚轴切成 1 cm 左右的小段, 于含有 1 mg L^{-1} NAA 和 0.5 mg L^{-1} BA 的 B_5 固体培养基上诱导形成愈伤组织, 将愈伤组织切成小块于含有 MS 大量元素、 B_5 微量元素和 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 的液体培养基中, 25℃, 100~120 r/min, 黑暗条件下悬浮培养, 每 2 周继代 1 次, 连续培养 1 年, 得到稳定的细胞系。稳定细胞系形成后保存在含有 MS 大量元素、 B_5 微量元素、 2 mg L^{-1} 2,4-D、 0.1 mg L^{-1} KT 和 30 g L^{-1} 蔗糖液体培养基中, 同样条件下培养, 每 2 周继代 1 次。

1.2 试验设置与培养条件

从常用于次生物质合成的 7 种培养基 MS、 B_5 、 MG_5 、 M_0 、LS、ER、White 中筛选出 B_5 、 MG_5 、ER 和 White 进行基本培养基的筛选。以筛选出的培养基作为基本培养基, 分别进行蔗糖浓度 7 个处理,

收稿日期: 2003 - 04 - 07; 修回日期: 2003 - 07 - 25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070525); 北京市科技新星项目 (9558101400)

*现在浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310029。

包括 0、30.0、50.0、80.0、100.0、120.0 和 140.0 g L⁻¹; PO₄³⁻ 浓度 13 个处理, 包括 0、1.25、3.0、5.0、8.0、10.0、12.0、16.0、20.0、30.0、50.0、80.0 和 100.0 mmol L⁻¹。培养基、蔗糖浓度和 PO₄³⁻ 浓度试验中每个处理 3 次重复, 每重复为 1 个培养瓶 (250 mL), 工作体积为 100 mL。

为了使细胞充分生长并奠定次生代谢的物质与能量基础, 在进行试验处理之前, 首先将细胞从保存培养基中转入生长培养基 (MS 大量元素、B₅ 微量元素、2,4-D 0.1 mg L⁻¹和蔗糖 30 g L⁻¹) 中, 同样条件下培养^[9]。离心法收集生长培养基中培养 2 周的细胞, 用相应处理的培养基冲洗细胞以去除残留的生长培养基, 离心弃去上清液, 用处理培养基重悬细胞后接种, 每瓶接种量为 10 mL, 接种后的培养瓶于黑暗条件下, 25 ℃, 120 r/min 进行震荡培养。

1.3 茄红素含量的测定

不同处理培养 2 周后, 用 Whatman No. 4 滤纸通过布氏漏斗真空抽滤 20 ~ 30 min 至无液滴滴下, 获得细胞鲜样, 每个处理随机取 3 个平行的鲜样样品。丙酮提取直接比色法测定茄红素含量^[10]。每个样品 1 mg, 加入 1 mL 丙酮用石英砂破碎细胞, 暗中提取 1 h, 室温避光震荡提取 30 min, 离心, 直接取 1 mL 上清液, 以丙酮为对照, U-340 Spectrophotometer HITACHI (Japan) 测定在 470 nm 处的光吸收值。胡萝卜新鲜肉质根中茄红素的提取按文献 [10] 进行, 茄红素分析和测定体系与细胞样品相同。茄红素含量用 3 个样品在 470 nm 处光吸收值的平均值表示 (A₄₇₀)。

采用 LSD 法对不同处理单位鲜样质量细胞的茄红素含量 (A₄₇₀) 进行差异显著性分析, 根据差异显著性分析结果筛选出适宜茄红素合成的处理。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的影响

茄红素合成代谢活性通过单位鲜样质量细胞的茄红素含量来反映, 茄红素含量用在 470 nm 处的光吸收值 (A₄₇₀) 表示。‘新透心红’细胞系在 B₅、MG₅、ER、White 中光吸收值 (表 1) 由高到低的次序为 MG₅、ER、B₅、White, 说明在 MG₅ 中细胞的茄红素含量最高, 茄红素合成代谢活性最强, 在 White 中细胞的茄红素含量最低, 茄红素合成代谢活性最弱。

2.2 蔗糖浓度的影响

以 MG₅ 为基本培养基, 不同蔗糖浓度条件下细胞光吸收值变化见表 1。当蔗糖浓度在 0 ~ 120 g L⁻¹ 范围内变化时, 随着浓度增加代谢活性增强, 浓度达到 120 g L⁻¹ 时光吸收值最高, 浓度高于 120 g L⁻¹, 细胞光吸收值急剧下降。0 ~ 120 g L⁻¹ 浓度范围内细胞光吸收值差异显著性分析 (表 1) 表明, 浓度在 100 ~ 120 g L⁻¹ 之间, 细胞光吸收值最高, 极显著地高于其它处理。浓度在 0 ~ 30 g L⁻¹ 时, 光吸收值最低, 极显著地低于其它处理。说明, 蔗糖浓度在 0 ~ 120 g L⁻¹ 范围内, 蔗糖浓度增加使得胡萝卜细胞茄红素合成代谢活性增强, 细胞中茄红素含量

表 1 不同处理胡萝卜悬浮细胞光吸收值差异显著性分析

Table 1 Significant difference analysis on the light absorption value of carrot suspension cells under different treatments (WL = 470 nm)

| 处理 Treatments | 平均数 Means (A ₄₇₀) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 培养基 Media | |
| MG ₅ | 0.4581 aA |
| ER | 0.4328 bA |
| B ₅ | 0.4215 bA |
| White | 0.1941 cB |
| 蔗糖 Sucrose | |
| (g L ⁻¹) | |
| 120 | 0.4962 aA |
| 100 | 0.4501 aA |
| 140 | 0.4001 abAB |
| 80 | 0.3518 bB |
| 50 | 0.3302 bB |
| 30 | 0.2440 cC |
| 0 | 0.1995 cC |
| PO ₄ ³⁻ | |
| (mmol L ⁻¹) | |
| 50.0 | 0.5468 aA |
| 30.0 | 0.4929 bAB |
| 20.0 | 0.4631 bcBC |
| 16.0 | 0.4363 cBC |
| 12.0 | 0.4230 cC |
| 10.0 | 0.3489 dD |
| 8.0 | 0.3260 deDE |
| 80.0 | 0.3153 deDEF |
| 5.0 | 0.2917 efDEF |
| 3.0 | 0.2726 fgEFG |
| 0.0 | 0.2428 ghFG |
| 1.25 | 0.2155 hG |
| 对照 Control | |
| 新鲜肉质根 Fresh root | 0.1895 |

增加。

2.3 PO_4^{3-} 浓度的影响

以 MG_5 为基本培养基, 不同 PO_4^{3-} 浓度下 ‘新透心红’ 细胞光吸收值变化见表 1。表 1 的结果表明, PO_4^{3-} 对胡萝卜悬浮细胞茄红素合成代谢具有显著的促进作用。在 $0 \sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$ 范围内, 随着 PO_4^{3-} 浓度的增加, 悬浮细胞光吸收值增大, 茄红素含量增加, 浓度为 50 mmol L^{-1} 时, 达到最大值。 PO_4^{3-} 浓度高于 50 mmol L^{-1} 对茄红素合成代谢表现出明显的抑制作用, 光吸收值急剧下降。 $0 \sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$ 范围内, 光吸收值差异显著性分析结果 (表 1), 50 mmol L^{-1} 与 30 mmol L^{-1} 处理之间悬浮细胞光吸收值在 5 % 水平上有差异, 在 1 % 水平上无差异, 极显著地高于其它处理。 $0, 1.25, 3 \text{ mmol L}^{-1}$ 处理之间在 1 % 水平上无差异, 光吸收值最低。说明 $30 \sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$ 浓度范围内, 细胞中茄红素含量高, 茄红素合成代谢活性最强, 而 $0 \sim 3 \text{ mmol L}^{-1}$ 范围内, 细胞中茄红素含量低, 茄红素合成代谢活性最弱。

3 讨论

本试验结果表明, 培养基因子对胡萝卜悬浮细胞茄红素合成代谢活性有极显著影响。 MG_5 作为基本培养基, 蔗糖浓度在 $100 \sim 120 \text{ g L}^{-1}$, PO_4^{3-} 浓度在 $30 \sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$ 有利于胡萝卜悬浮细胞茄红素的合成与积累, 在此培养体系中, 胡萝卜悬浮细胞中茄红素含量 ($A_{470} = 0.5821$) 高于其它处理, 茄红素合成代谢活性显著提高。

蔗糖作为重要的 C 源和能源, 对植物离体细胞次生物质 (莽草酸、花青苷, 胡萝卜素、萜醌等) 合成代谢的影响趋势相同, 即浓度增加有利于次生物质的合成与积累, 只是不同目的产物的适宜浓度不同^[3~5,8,9]。而 PO_4^{3-} 对不同代谢物质的影响不同, 利用植物细胞进行人参皂素合成时, PO_4^{3-} 浓度从 0.42 mmol L^{-1} 增加到 1.25 mmol L^{-1} , 人参皂素含量极显著地提高^[6], 而进行花青素苷合成时, 降低 PO_4^{3-} 浓度有利于细胞花青素苷的积累^[7]。本项研究的结果与其对人参皂素合成的影响趋势一致。

细胞悬浮培养是次生物质生产的一条有效途径^[2], 本试验再次证明了这一点。同时, 培养基体系的优化也是一个复杂的过程, 本试验报道了关于茄红素培养基体系的筛选结果, 为进一步深入研究提供了思路和方法。

参考文献:

- 1 Gerster H. The potential role of lycopene for human health. J. Amer. Coll. Nutr., 1997, 16: 109 ~ 126
- 2 Hirschberg J. Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10: 186 ~ 191
- 3 Rajendran L, Ravishankar GA, Venkataraman LV, et al. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. Biotechnology Letters, 1992, 14 (8): 707 ~ 712
- 4 Mok MC, Gabelman WH, Skoog F. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. J. Amer. Soc. Hortic. Sci., 1986, 101: 442 ~ 449
- 5 Noe W, Langebartels C, Seitz HU. Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. Inhibition by L-aminooxy- α -phenylpropionic acid and α -cinnamic acid. Planta, 1980, 149: 283 ~ 287
- 6 Fujita Y, Hara Y, Ogino T, et al. Production of Shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. Plant Cell Rep., 1981, (1): 59 ~ 60
- 7 Fujita Y, Hara Y, Suga C, et al. Production of Shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. A new medium for the production of shikonin derivatives. Plant Cell Rep., 1981, (1): 61 ~ 63
- 8 Nawa Y, Asano S, Motoori S, et al. Production of anthocyanins, carotenoids, and proanthocyanidins by cultured cells of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). Biosci Biotech Biochem., 1993, 57: 770 ~ 774
- 9 Jeong WY, Hyeon JK, Young JY. Optimizations of carotenoid biosynthesis by controlling sucrose concentration, Biotechnology Letters, 1990, 12 (12): 905 ~ 910
- 10 耿三省, 张平, 王健萱. 胡萝卜中胡萝卜素含量测定方法. 北京农业科学, 1996, (4): 24 ~ 26

Effects of Culture Medium Factors on Lycopene Synthesis in Carrot Suspension Cells

Liang Yan¹, Chen Daming^{2*}, Wang Ming¹, and Chen Hang²

(¹ Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; ² Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081, China)

Abstract : Taking a constant cell suspension system of carrot (*Daucus carota* L.) variety - Xin Touxinhong as material, the effects of basic medium, sucrose and PO_4^{3-} concentrations on lycopene synthesis activity of carrot suspension cells were studied by measurement and significant analysis on lycopene content of fresh cells per unit weight (in terms of light absorption values at 470 nm) among different treatments. The results showed that the lycopene content in carrot suspension cells under MG_5 medium was significantly higher than those under the other media, MG_5 was the most favorable basic medium for lycopene synthesis of carrot cells among MG_5 , ER, B_5 and White; on the basis of MG_5 medium, the lycopene contents under 100.0 - 120.0 g L^{-1} of sucrose concentration among 7 treatments and 30.0 - 50.0 mmol L^{-1} of PO_4^{3-} concentration among 13 treatments were very significantly higher than those of the other corresponding treatments, and better for lycopene synthesis of carrot cells.

Key words : *Daucus carota* L.; Sucrose concentration; PO_4^{3-} concentration; Lycopene synthesis; Cell suspension system

欢迎购阅《园艺学报》增刊

2000 年增刊目录:

苹果属植物区系地理学研究
应用同工酶技术鉴别同物异名柿
园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展
柑桔胞质杂种及其胞质遗传重组
类番茄茄 (*Solanum lycopersicoides*) 的研究进展
黄瓜基因及其连锁研究进展
黄瓜苦味研究概况
辣椒抗病基因工程研究中的主要问题与对策
辣(甜)椒根结线虫的危害、防治和抗病育种
温光处理调控观赏植物花期的研究进展
授粉对花衰老和乙烯生物合成的调节
彩叶植物多彩形成的研究进展
植物化学诱抗剂的研究现状与展望
拮抗菌控制果蔬采后病害研究进展
果蔬蜡液的种类及应用
桃果实水孔蛋白 cDNA 的分离
美国园艺研究简介
鲜菜供应系统的现代化
2001 年增刊目录:
果树转基因研究进展
柑桔果实有机酸代谢研究进展
果树根系对地上部的调控及其与水分利用效率的关系
阿月浑子 (*Pistacia vera* L.) 生殖生物学研究评述
蔬菜作物数量性状基因定位研究进展
蔬菜作物光合作用研究进展
胡萝卜雄性不育性研究及利用

分子标记在甘蓝类作物研究中的应用

番茄脐腐病发生机理研究综述
番茄青枯病的研究进展
番茄耐热育种研究进展

有关番茄果实中可溶性固形物和番茄红素的研究进展
芥子油苷研究进展及其在蔬菜育种上的应用前景
辣椒分子标记研究进展

我国辣椒杂交育种与杂交种子生产
昆明世界园艺博览园植物引种展示
比利时杜鹃研究进展

温室园艺作物生长发育模型研究现状与发展趋势
园艺植物的根系限制及其应用
绿色园艺——21 世纪中国园艺业的发展方向
十字花科蔬菜作物雄性不育的类型和遗传

2002 年增刊目录:

热激蛋白与园艺植物的耐冷性
园艺植物花器脱落研究进展
柑橘类胡萝卜素合成关键基因研究进展
葡萄设施栽培生理基础研究进展
多年生果树植物分子遗传作图
我国极早熟杏育种研究进展
蔬菜抗虫育种研究进展
雄性不育基因工程及其在蔬菜育种中的应用
蕨类植物组织培养研究进展
我国甘蓝遗传育种研究概况
若干花卉转基因研究的现状和前景
中国观赏植物资源现状与展望

每册定价 10 元,编辑部自办发行,欢迎广大读者购阅。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。