

长势较弱。鲍鱼菇最适 pH 为 6, 黑灵芝为 6, 猴头菇在 pH 值大于 8 时几乎不生长, 最适 pH 为 5, 羊肚菌最适 pH 为 7。

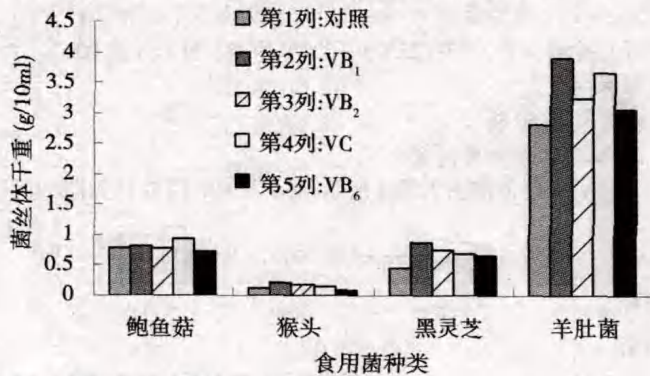


图 1 不同维生素对菌丝体生长的影响

表 4 pH 对食用菌菌丝体生长的影响

pH	菌丝体干重(g/10ml)			
	黑灵芝	猴头菇	羊肚菌	鲍鱼菇
5	0.009	0.023	0.192	0.167
6	0.016	0.013	0.202	0.128
7	0.012	0.008	0.368	0.117
8	0.007	0.002	0.345	0.120
9	0.002	-	0.249	0.109
10	-	-	0.191	0.087
11	-	-	0.009	0.032

2.6 不同温度对菌丝体生长的影响

表 5 温度对食用菌菌丝体生长的影响

温度(℃)	菌丝体干重(g/10ml)			
	黑灵芝	猴头菇	羊肚菌	鲍鱼菇
25	0.128	0.135	2.93	0.831
28	0.197	0.286	3.654	0.975
30	0.222	0.182	3.589	0.632
35	0.371	-	2.87	0.572

不同温度下各菌丝生长情况如表 5 所示, 鲍鱼菇菌丝在 25℃~35℃ 范围内均可生长, 在 25℃~28℃ 之间, 随培养温度的升高, 菌丝生长速率加快, 达到 28℃ 时菌丝生长最快; 随着温度升高, 黑灵芝菌丝体生长速度加快, 35℃ 时生长速度最大; 猴头菇菌丝 28℃ 为适宜培养温度; 羊肚菌菌丝在 25~35℃ 范围内均可生长, 最适温度为 28℃。

2.7 菌丝体生长过程的测定

在上述实验确定的各种食用菌菌丝体最适培养条件下, 对各食用菌菌丝体生长过程进行测定, 结果如图 2 所示。

从图 2 中可以看出, 4 种食用菌中, 羊肚菌生长情况最好,

培养 5d, 菌体干重可达 3.968g/10ml; 其次是鲍鱼菇, 培养 7d, 菌体干重为 1.08g/10ml; 黑灵芝生长速度较慢, 培养 7d, 菌体干重为 0.321g/10ml; 猴头菇菌丝生长速度最慢, 培养 7d, 菌体干重为 0.183g/10ml。

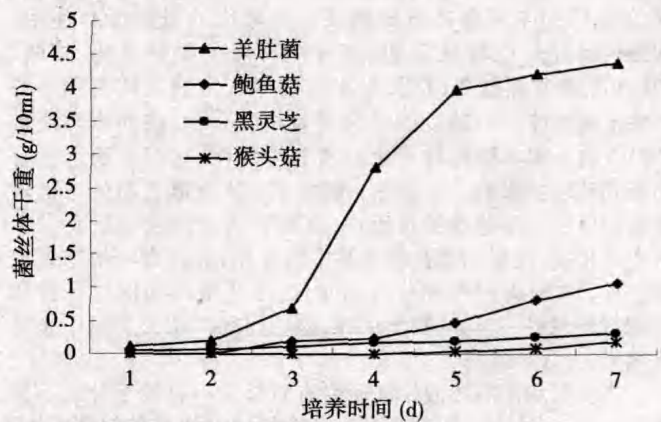


图 2 食用菌菌丝体的生长曲线

3 讨论

本文研究的 4 种食用菌: 鲍鱼菇、黑灵芝、猴头菇和羊肚菌都具有很高的营养价值, 同时也是食、药兼用的珍稀食用菌。目前, 对它们子实体和固体培养菌丝的研究较多, 而对鲍鱼菇、黑灵芝和猴头菇深层液体培养研究较少^[4-6]。这些食用菌的菌丝体所含成分以及所具有的功效都与子实体相似, 特别是羊肚菌菌丝体生长速度快, 适合液体培养。王莹等研究了粗柄羊肚菌菌丝体液体培养条件, 最适碳源为麦麸, 最适氮源为黄豆粉, 最适辅助碳源为玉米粉^[7]。本文获得的羊肚菌培养适宜碳源是蔗糖, 氮源是蛋白胨, 低分子物质会更有利于菌体的生长, 但相对成本较高。

参考文献:

- [1] 刘振江, 王红育. 食用菌功能食品的研究与开发[J]. 食品科技, 2007, 1: 29-31.
- [2] 熊艳, 车振明. 羊肚菌液体发酵培养的研究现状和展望[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 165-168.
- [3] 朱道红, 李春, 杨劲伟. 食用菌深层发酵工艺研究及功能性食品开发[J]. 生物技术, 2002, 12(6): 40-41.
- [4] 张柏松, 万鲁长, 张正. 培养基 pH 对鲍鱼菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报, 2007, 14(4): 62-64.
- [5] 杜曾荣, 常继东. 黑灵芝菌丝体培养条件的初步研究[J]. 食用菌, 2007, (1): 5-7.
- [6] 樊伟伟, 黄惠华. 猴头菇多糖研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 355-358.
- [7] 王莹, 孙永海, 王笑, 等. 粗柄羊肚菌菌丝体液体培养条件的优化[J]. 食用菌, 2007, (6): 6-8.

植物组织培养培养基有机组分时效分析

谢丽琼, 常菊芹, 宋祥春, 杨毅

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的: 研究植物组织培养常用培养基中有机成分肌醇、烟酸、VB₆、VB₁ 等物质在不同保存条件下含量变化。方法: 高效液相的方法检测这几种有机物质在 4℃、室温、冷冻保存、高温后保存条件下, 含量随时间的变化关系。结果: 肌醇化学性质稳定, 可长期保存; 维生素族化合物 20d 左右时已至少降解 40%, 不能再使用。结论: 培养基中上述有机物质应分开配制使用。

关键词: 肌醇; 烟酸; VB₆; VB₁; 培养基

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2008)04-0069-03

The Organic Ingredients Change Analyse in Medium of Plant Callus Culture

XIE Li - qiong, CHANG Ju - qin, SONG Xiang - chun, YANG Yi

(Life Science and Technology Department in Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Objective: To study on the changes of the organic ingredients which are inositol, nicotine acid, VB₁ and VB₆ used in plant callus culture. Method: The paper analyzed the four substances changes with high performance liquid chromatograph during the different reserved condition, the room temperature, 4℃, freezing and high temperature. Result: It indicated that inositol can preserve in long run and the vitaminic matters disintegrated about 40% in 20 days. Conclusion: Inositol and the vitaminic matters should be confected and used respectively.

Key words: inositol; nicotine acid; VB₆; VB₁; medium

通过不同的培养基培养植物组织和细胞,是目前植物生物工程的最基本技术手段之一。植物组织细胞培养的常用培养基一般分成四个部分:大量元素、微量元素、铁盐和有机成分,使用中通常将各部分配制成一定浓度的母液配合使用。前三种组分是比较稳定的,而有机母液主要是肌醇、烟酸、VB₆、VB₁和甘氨酸等组成,是由植物体正常物质代谢和某些特殊生理功能不可缺少的低分子有机化合物,植物体必须自外界获取。因其结构和理化性质的特殊性,它们的稳定性容易受到环境的影响。实验室一般采用一次配制大量的有机母液长期使用。在储藏的过程中,有机物的含量及性质会发生很大变化,从而影响其在培养基中的作用,最终影响植物组织的生长。有机母液各成分有何变化,变化情况与储存条件和时间有何关系,变化的幅度怎样,这一问题在相关文献中未见有报道。

本实验利用高效液相法研究有机母液中有机组分在不同保存条件下的变化,研究母液中各有机组分的最佳保藏温度、存储方式及有效使用期,以保证各有机物质能得到最充分的利用,减少实验误差。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

植物组织培养基中使用有机母液(200倍),成分主要有有肌醇、烟酸、VB₆、VB₁和甘氨酸。分别保存在不同环境条件下以备试验用。

1.1.2 试剂

乙腈、甲醇、磷酸、肌醇、烟酸、VB₆、VB₁购于天津第二试剂厂,分析纯。

1.1.3 仪器

惠普SP-1100型高效液相色谱仪,岛津LC-10Avp高效液相色谱仪。

1.2 方法

1.2.1 肌醇色谱方法^[1,2]

SP-1100型高效液相色谱仪色谱柱为C₁₈(15cm×4.6cm);流动相为V(乙腈):V(水)=10:90的溶液,经超声脱气,流速0.6ml·min⁻¹;检测波长196nm;进样量:10μL;柱温:室温;峰面积:外标法定量。

1.2.2 烟酸、VB₆、VB₁色谱条件^[3-5]

岛津LC-10Avp高效液相色谱仪反相C₁₈柱(日本岛津公司);C₁₈(150×4.6mm);流动相为V(甲醇):V(水):V(85%磷酸)=55:45:1的溶液;经超声脱气,流速0.3ml·min⁻¹;检测波长254nm;进样量:10μL;柱温:室温;峰面积:外标法定量。

1.2.3 样品准备

肌醇标准溶液[准确称取0.25g肌醇标准品,用流动相1V(乙腈):V(水)=10:90定容至25ml];烟酸标准溶液[准确称取10mg烟酸标准品,用流动相2V(甲醇):V(水):V(85%磷酸)=55:45:1(加辛基磺酸钠)定容至10ml];维生素B₆标准溶液[准确称取10mg维生素B₆标准品,用流动相2V(甲醇):V(水):V(85%磷酸)=55:45:1(加辛基磺酸钠)定容至10ml];维生素B₁标准溶液[准确称取10mg维生素B₁标准品,用流动相2V(甲醇):V(水):V(85%磷酸)=55:45:1(加辛基磺酸钠)定容至10ml];乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为化学纯。

测试样品肌醇10.2mg·ml⁻¹,烟酸5.5mg/ml,维生素B₆5.5mg·ml⁻¹,维生素B₁4.5mg·ml⁻¹,分别在以下四种条件下不同时间检测:4℃、室温(25℃)、-20℃冷冻、121℃灭菌20min后室温保存。

2 结果与分析

2.1 肌醇含量的时间变化

肌醇标准色谱图如图1所示;45d内的时间变化如图2所示。

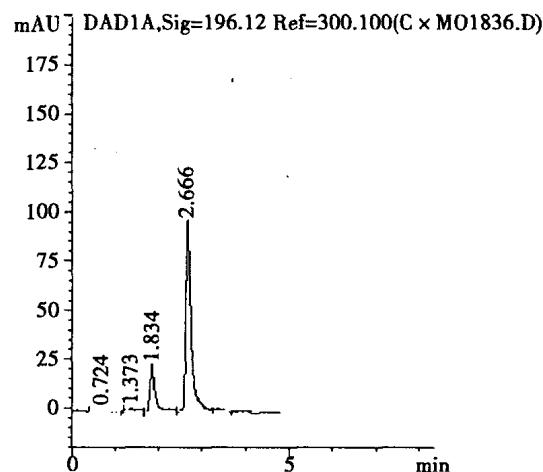


图1 肌醇标准色谱图

Fig.1 HPLC chromatography of standard inositol

色谱条件:流动相乙腈:水=10:90,流速0.6ml/min;检测波长196nm;进样量:10μL。

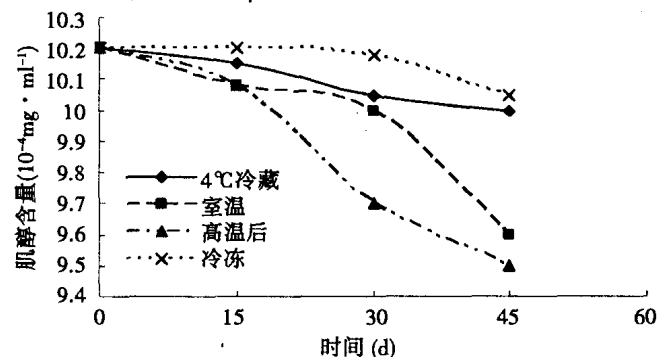


图2 不同条件下肌醇随时间的变化

Fig.2 Inositol changes in different conserved condition

4种不同温度下处理保存的肌醇样品含量随时间延长都在减少;其中冷冻保存肌醇含量变化较慢,45d减少了1.96%;4℃保存样品30d含量约下降1.47%,变化与冷冻条件差异不大;常温和高温处理后保存在30d肌醇含量分别下降了1.96%和4.9%;同时实验还检测到4℃条件下保存150d,含量下降8.5%,保存240d,含量下降约17%。总的来看,4种条件下肌醇含量变化都不显著,化学性质稳定。

2.2 维生素B₁

维生素B₁标准色谱图如图3(A)所示;20d内的时间变化图如图4所示。

4种不同温度下处理保存的维生素B₁样品含量随时间延长变化较快;保存10d时,常温和高温处理后保存的样品含量已下降约50%,4℃保存样品在15d含量约下降一半,20d时,4种条件下样品中维生素B₁下降69%,其中高温处理后保存的样品下降95%,样品基本上不能再使用。

2.3 维生素B₆

维生素B₆标准色谱图如图3(B)所示;20d内的时间变化

图如图5所示。4种不同温度下处理保存的维生素 B_6 样品含量随时间延长变化较快;20d时,4种条件下样品中维生素 B_6

分别下降40~83%,其中15d左右时,4℃保存的样品含量基本下降50%,样品基本上不能再使用。

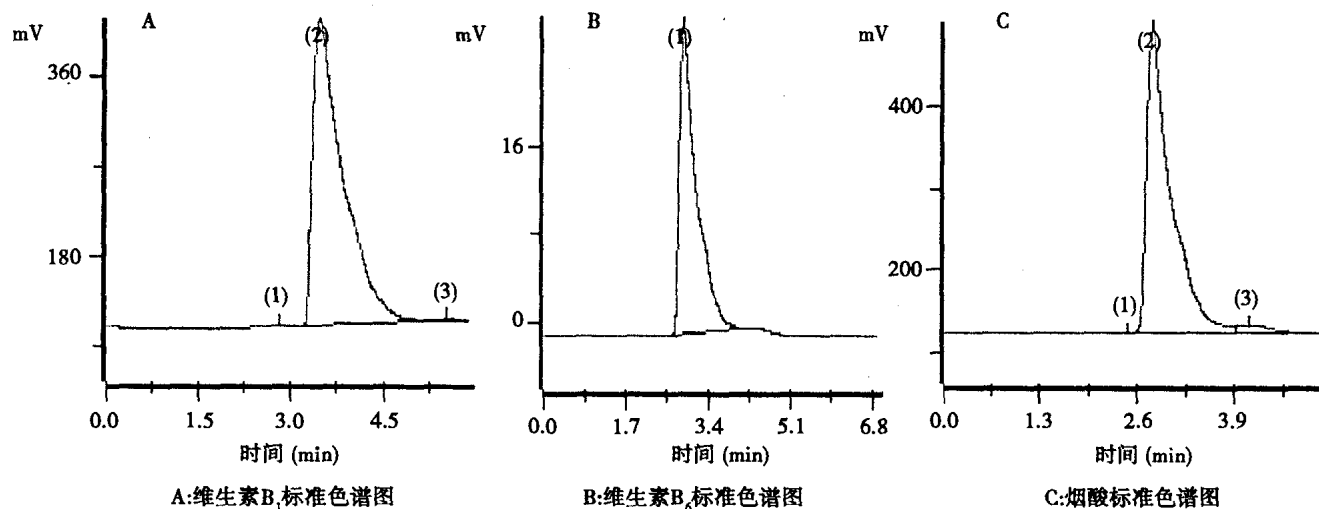


图3 维生素标准色谱图

Fig.3 HPLC chromatography of standard vitamin B_1 , B_6 and nicotine acid

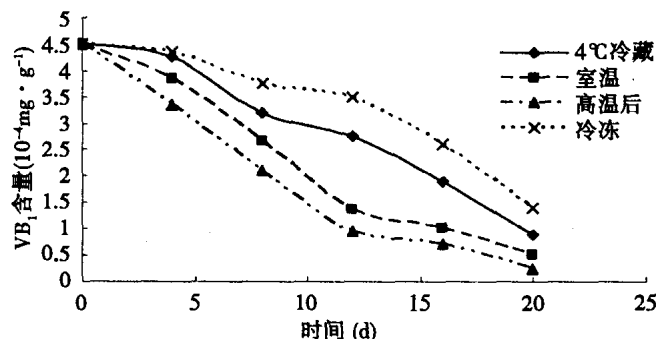


图4 不同条件下维生素 B_1 含量时间变化图

Fig.4 Vitamin B_1 changes in different conserved condition

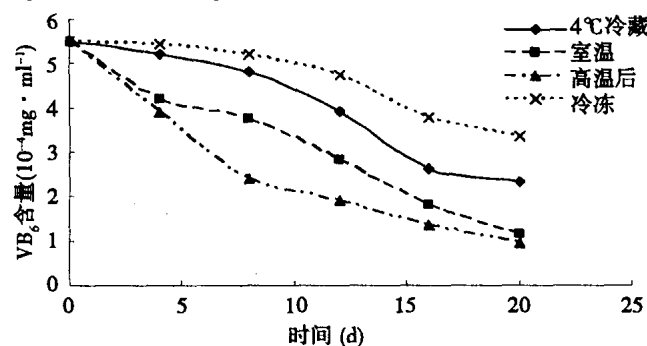


图5 不同条件下维生素 B_6 含量时间变化图

Fig.5 Vitamin B_6 changes in different conserved condition

2.4 烟酸

烟酸标准色谱图如图3(C)所示;50d内的时间变化图如图6所示。冷冻处理保存的烟酸样品含量随时间延长变化较小,20d时下降约13%;4℃、常温和高温处理后保存的样品含量分别下降43%、65%和75%,变化显著。

3 讨论

有机母液组分的最佳保存温度是冷冻条件;根据实验结果有机母液组分中各物质的保存时限不同:肌醇母液一般可保存几个月左右;烟酸母液20d左右; VB_6 母液16d左右; VB_1 母液10d左右。由于现在实验室通常将有机成分配制混合母液保存,根据实验数据,为避免因各种有机成分分解速度不同而造成的实际加入量的变化误差,影响植物组织培养过程,建

议肌醇与烟酸、 VB_6 、 VB_1 维生素族有机成分分别配制分别保存,后者使用时间不超过15d。同时,植物组织培养过程中,如果维生素族组分是影响再生等问题的重要因素,建议缩短继代培养,以保证培养基中有充分的有机营养物质提供。

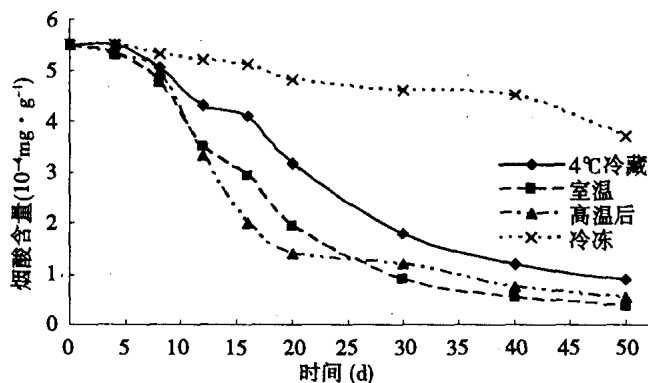


图6 不同条件下烟酸含量时间变化图

Fig.6 Nicotine acid changes in different conserved condition

国内已有各种植物组织培养用基础培养基成品出售,但由于成品售价较高,国内许多实验室目前仍然在配制各种母液混合使用。组织培养是现代生物技术的基础手段,保持培养基组分的持续和稳定才能保证实验的可重复性,保证基因的转化和再生植株筛选工作的进行。因此,在不能使用成品培养基的情况下,根据培养基中各有机组分的化学性质有选择性的改变其保存条件和使用期限,同样也能达到很好的试验效果。

参考文献:

- [1]景丽洁,王建刚,王树清,等.反相高效液相色谱法测定肌醇[J].色谱,2003,(3):259-260.
- [2]刘珊珊,吴琼珠.高效液相色谱法测定赖氨酸肌醇维 B_{12} 口服溶液中维生素 B_{12} 及肌醇的含量[J].药学与临床研究,2007,15(5):371-374.
- [3]梁明,尹泳一,周靖.水溶性维生素在高效液相色谱上的分离条件[J].当代化工,2004,(2):119-120.
- [4]郝荣辉,夏敏,谷学新.反相高效液相色谱同时测定动物营养液中B族维生素[J].现代科学仪器,2006,(6):81-83.
- [5]刘敏,郑伟涛.HPLC法测定功能性饮料中多种B族维生素的含量[J].检测与分析,2006,(5):39-41.