

喜树细胞悬浮培养体系的建立

刘菲, 彭克勤*, 彭志红, 夏石头, 萧浪涛

(植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以喜树的幼嫩叶片为材料, 探讨了 MS、SH、B5 基本培养基和不同激素 (2,4-D、NAA、6-BA) 对比对愈伤组织诱导及继代培养的影响, 并筛选喜树细胞悬浮培养体系的最优培养基配方。结果表明, 喜树幼嫩叶片外植体诱导愈伤培养以 SH+2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 为最优, 愈伤组织诱导率为 92%。继代培养以 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为最适, 在此条件下诱导的愈伤组织质地疏松, 适于进行悬浮培养。

关键词: 喜树; 愈伤组织; 组织培养; 悬浮培养

中图分类号: Q943.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0528-03

Establishment of the cell suspension culture system of *Camptotheca acuminata*

LIU Fei, PENG Ke-qin*, PENG Zhi-hong, XIA Shi-tou, XIAO Lang-tao

(Key Laboratory of Hunan Provincial Phytohormones and Growth Development, Changsha 410128, China)

Abstract: The young leaves and stems of *Camptotheca acuminata* were used as the materials to study the effects of basic media and the phytohormone combination on callus induction and subculture of the callus and screen out the best cultural formula for cell suspension culture system of *Camptotheca acuminata*. The results showed that most suitable medium for callus induction was SH with 2.0 mg/L NAA and 0.5 mg/L 6-BA, and the callus inducing rate was 92%. MS medium with 2.0 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA was found to be the best subculture medium formula, and the callus induced under these conditions and it was suitable for cell suspension culture.

Key words: *Camptotheca acuminata*; callus; tissue culture; suspension culture

喜树碱(camptothecin, CPT)具有抗癌活性^[1]。由于喜树碱在植物组织中含量低, 仅为干重的 0.02%~0.6%^[2-3], 且野生状态下喜树资源不稳定, 单纯靠从植物中提取喜树碱不能满足需要。笔者以喜树幼叶为外植体, 研究在不同的培养基上诱导愈伤组织及继代培养愈伤组织, 进而建立喜树的细胞悬浮培养体系, 以期利用愈伤组织或悬浮细胞培养进行喜树碱的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 取喜树幼叶作为外植体, 流水下反复冲洗

并晾干, 以 75% 的乙醇溶液消毒 30 s, 无菌水冲洗 1 次, 再转入 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 6~8 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 晾干后切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块。喜树碱(CPT)标准样品为 Seebio 产品, 纯度为 98.0%。

(2) 以 MS、SH、B5 为基本培养基, 附加不同质量浓度 (0.2、0.5、1 mg/L) 6-BA、2,4-D (0.5、1、2 mg/L)、NAA (1、2、5 mg/L) 等, 设置愈伤组织诱导、愈伤组织继代、愈伤组织悬浮培养 3 种培养基。培养基中蔗糖质量浓度为 30 g/L, 琼脂 0.7%, pH 5.8~6.0。培养条件为: 温度 (25±2) °C, 光照度 1 500~2 000 lx, 每天光照 12~14 h^[4]。

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 湖南农业大学青年科学基金项目 (07QN27)

作者简介: 刘菲 (1976—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生; *通讯作者, pkq8055@hunau.net

1.2 方法

1.2.1 基本培养基的筛选和愈伤组织的诱导

将外植体分别接种在 MS+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA、SH +1 mg/L NAA +0.5 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA、B5 +1 mg/L NAA +0.5 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA 培养基上,观察不同培养基对愈伤组织诱导的影响。在基本培养基筛选的基础上,选出最优基本培养基。以最优基本培养基为培养基,设计 18 种不同激素组合的诱导培养基,每种组合 10 瓶,每瓶接种外植体 3 块,连续培养 30 d,观察并统计诱导结果。

1.2.2 愈伤组织生长曲线的制定

选取长势较好的愈伤组织,继代培养在 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 和 SH+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基上,接种量约为 2 g/瓶,连续培养 25 d。每 5 d 取样称重 1 次,每个处理 3 次重复,结果取平均值。

1.2.3 细胞悬浮培养体系的建立

取连续继代 4 次、质地疏松易碎的愈伤组织,接种于附加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的 MS、SH、B5 液体培养基中进行悬浮培养,观察培养物状态,测定细胞生长量及喜树碱含量。悬浮培养条件:pH 值约 5.8,摇床转速 120 r/min,100 mL 三角瓶中液体培养基为 80 mL,接种量约为 20 g/L,培养周期为 20 d。

1.2.4 愈伤组织喜树碱含量的测定

参照文献[5~6]方法进行。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

叶片外植体在 3 种基本培养基上均能诱导出愈伤组织,以 SH 培养基启动最快,培养 5 d 后即可观察到外植体膨大、卷曲,12 d 后叶片外植体周围长出淡黄色的愈伤,愈伤组织均长在贴近培养基的一面,随着培养时间的延长,有的愈伤组织表面变成红色(此红色物质为喜树愈伤组织在光诱导下产生的花色苷^[7])。30 d 后统计诱导结果显示,在 SH 基本培养基上诱导率最高,为 81%,且出愈伤时间最短,为 12 d,而 B5、MS 基本培养基上的诱导率偏低,分别为 50% 和 32%,出愈伤时间分别为 15 d 和 18

d。故采用 SH 培养基为基本培养基。

2.2 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

以 SH 培养基为基本培养基,考察激素组合对喜树叶片愈伤组织诱导培养的影响。结果(表 1)发现,NAA 的诱导效果比 2,4-D 要好,其中以 5 号和 6 号培养基的诱导率较高,分别达到 92% 和 90%,且愈伤组织的生长势较好,愈伤组织呈淡黄色或有粉红色的小颗粒,质地比较紧密,经多次继代后适于进行悬浮培养。故愈伤组织诱导以 SH+2.0 mg/L NAA +0.5 mg/L 6-BA 培养基较好。

表 1 不同激素组合对喜树愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of combinations of different hormone on callus induction of *Camptotheca acuminata*

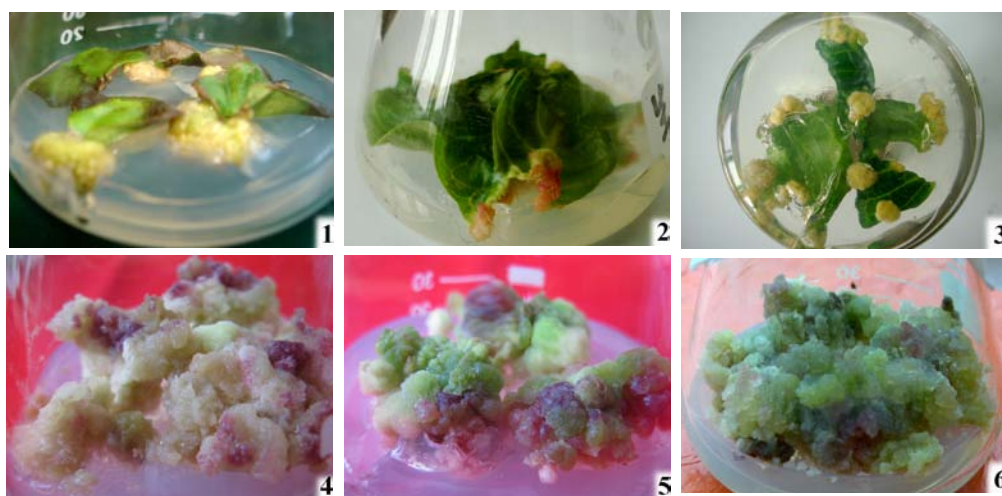
序号	激素组合及质量浓度/(mg·L ⁻¹)	接种外植体/块	出愈外植体/块	诱导率/%	生长势
1	6-BA0.2+NAA1	21	10	48	较好
2	6-BA0.2+NAA2	28	21	76	好
3	6-BA0.2+NAA5	15	10	67	较好
4	6-BA0.5+NAA1	24	13	56	一般
5	6-BA0.5+NAA2	24	22	92	好
6	6-BA0.5+NAA5	25	22	90	好
7	6-BA1+NAA1	18	7	38	一般
8	6-BA1+NAA2	22	14	66	较好
9	6-BA1+NAA5	30	19	63	较好
10	6-BA0.2+2,4-D0.5	27	4	15	一般
11	6-BA0.2+2,4-D1	13	3	26	较好
12	6-BA0.2+2,4-D2	24	10	45	较好
13	6-BA0.5+2,4-D0.5	21	4	18	一般
14	6-BA0.5+2,4-D1	24	7	32	较好
15	6-BA0.5+2,4-D2	21	9	45	好
16	6-BA1+2,4-D0.5	18	4	23	一般
17	6-BA1+2,4-D1	23	11	48	较好
18	6-BA1+2,4-D2	30	17	59	较好

诱导率均以未污染外植体计数;激素后数值表示质量浓度。

2.3 愈伤组织生长曲线

比较 MS 和 SH 培养基上继代培养的情况(图 1),发现 SH 培养基上的愈伤组织经继代 1~2 次后,松软湿润,表面呈水渍状,不适于进行悬浮培养,因此继代培养选用 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基,25 d 继代 1 次,连续继代 4 次后,挑选疏松易碎的愈伤组织进行悬浮培养。愈伤组织的生长曲线如图 2 所示。愈伤组织生长曲线呈 S 形,0~10 d 为延迟期,细胞生长缓慢,10 d 后进入对数生长期,持续至第 25 天,是生物量积累的主要阶

段, 25 d 后为细胞生长平稳期。



1 MS 培养基上诱导的愈伤组织; 2 SH 培养基上诱导的愈伤组织; 3 B5 培养基上诱导的愈伤组织; 4 SH 培养基上继代 1 次的愈伤组织; 5 MS 培养基上继代 1 次的愈伤组织; 6 MS 培养基上继代 4 次的愈伤组织。

图 1 喜树幼叶愈伤组织的诱导

Fig.1 Callus induction of *Camptotheca acuminata*'s leave

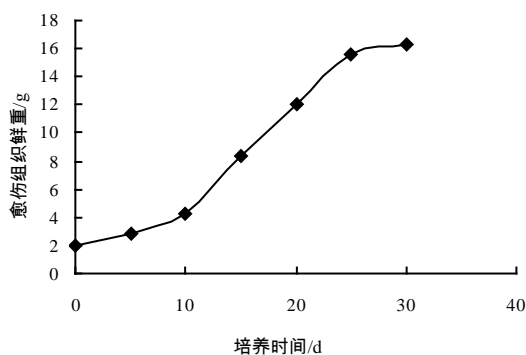


图 2 愈伤组织生长曲线

Fig.2 The growth curve of callus

2.4 细胞悬浮培养体系

表 2 结果显示, 喜树细胞在 SH 培养基中生长量最低, 并且在生长过程中有褐化死亡现象; 在 MS, B5 培养基中细胞生长量较大, 但 MS 培养基中次生代谢物质 CPT 积累量较高, 因此, MS 培养基可作为喜树细胞悬浮培养的最适培养基。培养过程中每 20 d 继代 1 次, 连续继代 4 次后, 愈伤组织建立的细胞悬浮系生长迅速, 颜色淡黄, 分散性和均一性较好。

表 2 培养基对悬浮细胞培养的影响

Table 2 Effects of different media on suspension culture

培养基	细胞鲜重增重/g	CPT 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	培养基状态	细胞
SH	4.39	23.4	褐色浑浊	深褐色
MS	7.26	22.8	黄色浑浊	黄白色

B5	7.68	13.8	黄色浑浊	淡黄色
----	------	------	------	-----

参考文献:

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, et al. Plant antitumor agents I. The isolation and structure of Camptothecin novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*[J]. J Am Chem Soc, 1966, 88: 3888-3890.
- [2] Liu Z, Zhou G, Xu S, et al. Provenance variation in camptothecin concentrations of *Camptotheca acuminata* grown in China[J]. New Forest, 2002, 24: 215-224.
- [3] 郭勇, 林桂芸, 孙雁霞, 等. 喜树叶片中喜树碱含量的季节变化研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(1): 143-145.
- [4] 刘清波, 廖兵辉, 蒋建雄, 等. 龙芽百合鳞球增重及生根培养研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(4): 375-377.
- [5] Van-Hengel A J, Harkes M P, Wichers H J, et al. Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1992, 28: 11-18.
- [6] 阎秀峰, 王洋, 于涛, 等. 喜树叶中喜树碱含量的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 2002, 22(2): 15-18.
- [7] 顾青, 朱睦元. 光照对喜树愈伤组织生理及喜树碱合成的影响[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(3): 280-284.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平