

除虫菊细胞的悬浮培养

李小六* 陈超 李艳梅 石洪凌 王红美

唐山师范学院生物科学技术系, 唐山 063000

提要 除虫菊悬浮细胞从培养后第8天开始迅速生长, 14 d达到最大生长量, 其最适培养基为: MS+4 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹ 蔗糖, 最适接种量为 15 g·L⁻¹, 摇瓶装液的体积分数为 40%, 初始培养的最适 pH 值为 5.8, 收获时 pH 下降为 4.6±1, 最适培养温度为 25℃。

关键词 除虫菊; 细胞悬浮培养; 生长条件

Cell Suspension Culture of *Pyrethrum cinerariifolium*

LI Xiao-Liu*, CHEN Chao, LI Yan-Mei, SHI Hong-Ling, WANG Hong-Mei

Department of Biological Science and Technology, Tangshan Teachers College, Tangshan 063000

Abstract The rapid growth of *Pyrethrum cinerariifolium* suspension culture cell was on the 8th day and the maximum growth amount was obtained on the 14th day. The optimum medium was MS added 2,4-D 4 mg·L⁻¹ and NAA 0.1 mg·L⁻¹, 6-BA 0.3 mg·L⁻¹ and sucrose 30 g·L⁻¹. The optimum culture situations were obtained as follows: seed volume was 15 g·L⁻¹, the liquid medium volume per flask was 40%, the initial pH was 5.8, the last pH was 4.6±1, the optimum temperature was 25℃.

Key words *Pyrethrum cinerariifolium*; cell suspension culture; growth condition

从除虫菊经提取和加工后获得的除虫菊酯生物农药, 具有快速、高效、安全的优点。目前, 除虫菊酯主要从除虫菊干花中提取, 其环节多, 耗时费力, 且产量受环境和季节限制, 以致除虫菊酯的生产成本高, 产量低, 难以满足市场需求。本文以除虫菊花蕾为材料, 诱导愈伤组织, 进行细胞的悬浮培养, 获得了较为稳定的细胞悬浮系, 并对悬浮细胞生长的优化条件作了探讨, 目的是用植物生物反应器建立大规模除虫菊细胞培养体系, 大量生产除虫菊酯等杀虫成分, 进而工厂化生产天然除虫菊酯杀虫剂。植物反应器生产除虫菊酯可节约土地, 投资小, 产出高, 有一定的开发前景。国内有关除虫菊组织培养的研究多集中在愈伤组织的诱导和植株再生^[1], 关于细胞悬浮培养尚未见报道。

材料与amp;方法

取除虫菊(*Pyrethrum cinerariifolium*)未成熟花蕾, 于4℃下处理24 h, 70%乙醇消毒30 s, 再转入0.1% HgCl₂溶液中消毒5 min, 无菌水冲洗3~4次, 剥去花萼后接种。初始诱导及继代培养基为: MS+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1

mg·L⁻¹ 6-BA+20 g·L⁻¹ 蔗糖, 琼脂5 g·L⁻¹, pH 5.8; 初始液体培养基同上, 不加琼脂。取1.5 g继代培养20 d的愈伤组织, 接入装有30 mL液体培养基的100 mL三角瓶中进行细胞悬浮培养, 摇床转速为80 r·min⁻¹, 12 d继代一次, 筛选建立稳定的细胞悬浮培养系, 并进行细胞学观察^[2]。

细胞生长量测定采用细胞干重法, 将愈伤组织细胞或细胞悬浮培养液过滤得到的细胞培养物, 在烘箱(60℃)中烘干至恒重, 称重即得干重(DW)。每个处理重复3次。

测定细胞生长曲线时, 于无菌环境下称取1.5 g湿重除虫菊愈伤组织, 接入装有100 mL液体培养基的250 mL三角瓶中, 放在摇床上进行悬浮细胞培养, 摇床转速80 r·min⁻¹, 温度为25℃。每2 d取3瓶, 测定细胞生长量, 并测定相应的过滤液的pH值^[3~6]。

在我们以往工作的基础上, 对2,4-D、NAA、

收稿 2004-03-18 修定 2004-08-25

资助 唐山市科技局硕博基金(02813031A-4-1)、河北省教育厅自然科学研究计划项目(Z2002202)。

* E-mail: lixiaoliu666@163.com, Tel:0315-3885207

6-BA、蔗糖4个因素3个水平进行正交试验^[7], 共9种培养基(各6瓶), 正交实验的因素水平表见表1。

表1 正交实验因素水平
Table 1 Factor level of orthogonal trial

水平	因素			
	A (2, 4-D/mg·L ⁻¹)	B (NAA/mg·L ⁻¹)	C (6-BA/mg·L ⁻¹)	D (蔗糖/g·L ⁻¹)
1	2	0.1	0.1	20.000
2	3	0.3	0.2	30.000
3	4	0.6	0.3	40.000

表2 正交试验L9(3⁴)

Table 2 Orthogonal trial L9(3⁴)

编号	A	B	C	D	细胞增加量/g(DW)·L ⁻¹
1	1	1	1	1	0.2060
2	1	2	2	2	0.2232
3	1	3	3	3	0.1856
4	2	2	3	1	0.1684
5	2	3	1	2	0.2016
6	2	1	2	3	0.1892
7	3	3	2	1	0.1356
8	3	1	3	2	0.2468
9	3	2	1	3	0.2280
K 1	0.6148	0.6420	0.6356	0.5100	
K 2	0.5592	0.6196	0.5480	0.6716	
K 3	0.6104	0.5228	0.6008	0.6028	
k1	0.2048	0.2140	0.2120	0.1700	
k2	0.1864	0.2064	0.1868	0.2240	
k3	0.2036	0.1744	0.2004	0.2008	
R	0.0184	0.0396	0.0252	0.0540	

主→次: D>B>C>A。

终确定8号培养基(MS+4 mg·L⁻¹ 2, 4-D+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹ 蔗糖)为除虫菊细胞的最适培养基。

2 除虫菊花蕾愈伤组织的诱导、细胞悬浮培养系的获得和细胞形态学观察

花蕾接入后, 15 d后开始出现愈伤组织, 初期生长缓慢, 转入继代培养基后, 愈伤组织生长加快, 1个月后可以增重数倍, 出现了多种类型的愈伤组织(图1-a), 黄色或淡黄色愈伤组织的细胞大多为圆形, 细胞之间联系紧密, 多个细胞成

结果与讨论

1 优化培养基的选择

采用L9(3⁴)表头设计进行正交试验, 测定各组合不同培养基成分影响悬浮细胞生长量(干重), 并进行方差分析。结果表明(表2), D因素(蔗糖)的R值为0.0540, 大于B因素(NAA)、C因素(6-BA)和A因素(2, 4-D)的R值。极差愈大, 反映此种因素水平变动时, 指标的变化愈大, 即该因素对指标的影响愈大。由此, 判断各因素对指标影响的主次顺序为: 蔗糖>NAA>6-BA>2, 4-D, 即蔗糖对细胞生长的影响最大。根据正交实验, 最

为细胞团(图1-b)。每隔20 d继代一次。

图1-a所示的黄色或淡黄色愈伤组织转到液体培养基上进行悬浮培养(图1-c), 初期的细胞不规则, 细胞质稀薄, 有许多长形的细胞出现。每隔12 d继代一次。随着继代次数的增加, 不规则的细胞减少, 圆形或椭圆形的细胞增多(图1-d)。

3 除虫菊细胞的生长和生长进程

从图2~7可见:

(1)除虫菊悬浮细胞生长量随着时间的变化约呈“S”形(图2)。接种后1~4 d内细胞生长缓慢;

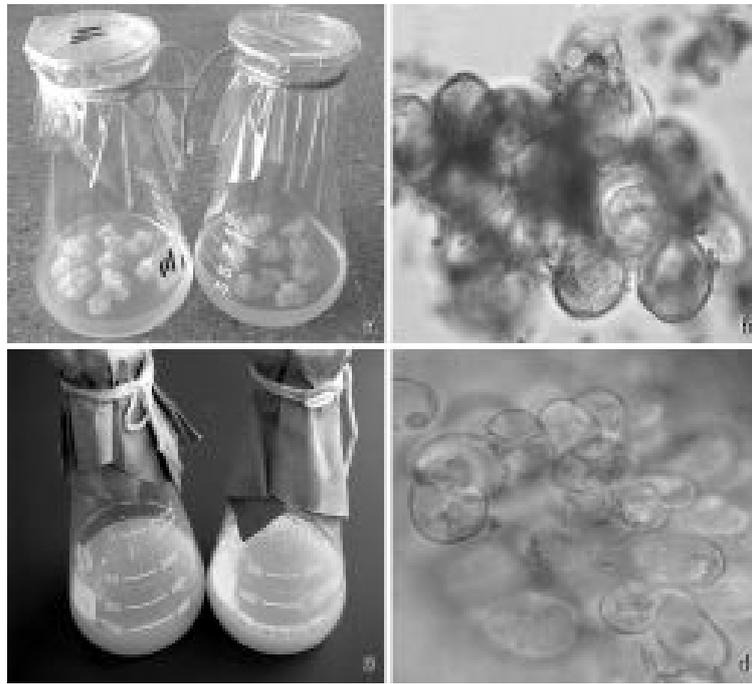


图1 除虫菊细胞悬浮培养

Fig. 1 Cell suspension culture of *Pyrethrum cinerariifolium*

a. 除虫菊花蕾诱导的愈伤组织; b. 除虫菊愈伤组织的小细胞团(600×); c. 除虫菊细胞悬浮培养物; d. 除虫菊细胞悬浮培养的细胞(600×)。

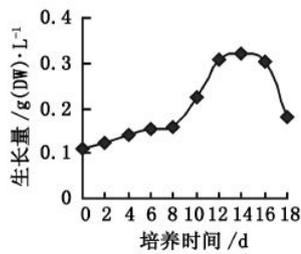


图2 细胞生长曲线

Fig. 2 The curve of cell growth

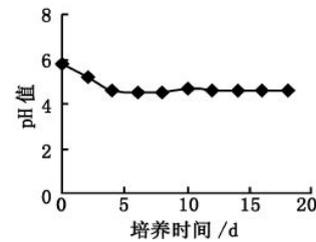


图3 悬浮细胞生长中pH值的变化

Fig. 3 Change in pH in suspension cell growth

4~8 d后, 生长加快; 8~14 d内细胞迅速增殖, 呈直线上升趋势; 在14 d时生长量达到最大, 以后细胞增殖减慢, 直到衰老。在悬浮培养的前4 d, pH值急剧下降, 之后变化不大(图3)。

(2) 随着接种量的增加, 细胞增加量也随之增大, 接种量为15 g·L⁻¹, 细胞的增加量最大, 之后细胞增加量随着接种量的增加而减小。这说明悬浮细胞在其它条件相同的情况下, 细胞生长有一个最低接种密度, 低于此密度时, 细胞生长速率就降低或根本不生长, 而细胞干重一般是随着接种量增加而增加的, 接种量过大, 营养物质大量消耗, 而导致悬浮细胞生长缓慢。因此, 接种

量选择15 g·L⁻¹为最好(图4)。

(3) 随着装液量的增加, 除虫菊细胞增加量增

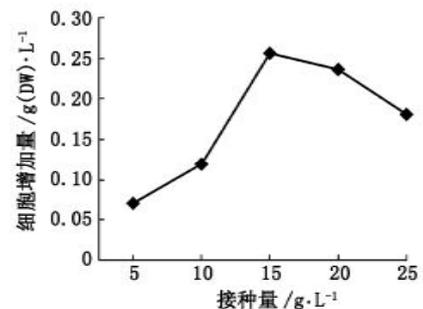


图4 接种量对细胞生长的影响

Fig. 4 Effect of seed volume on cell growth

大, 100 mL时最大; 大于100 mL时, 细胞的增加量而减小(图5)。这可能是装液量不同的培养基中溶氧量高低不同造成的。

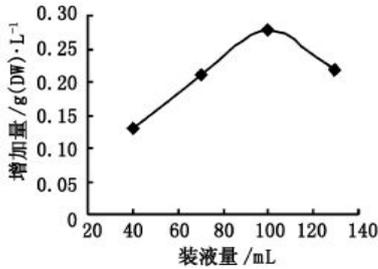


图5 装液量对细胞生长的影响

Fig. 5 Effect of the liquid medium volume per flask on cell growth

(4) 除虫菊悬浮细胞培养至14 d时, 进入对数生长后期。此时取样分析的结果(图6)显示: pH值为5.8时, 细胞生长量最大; pH值小于5.8时, 细胞生长量则随着pH值的降低而降低; pH值大

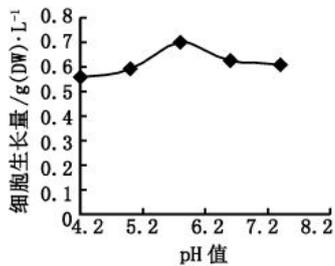


图6 pH值对细胞生长的影响

Fig. 6 Effect of pH on cell growth

于5.8时, 细胞生长量随着pH值的增大而降低。说明培养的最佳pH值为5.8。

(5) 温度相对低的条件下, 细胞增长缓慢, 随着温度的增加, 细胞增加量也增大, 25℃为最适温度; 温度继续升高时, 细胞可能过早衰老以致细胞增加量迅速下降(图7)。

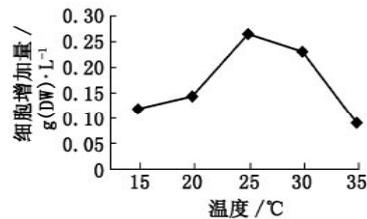


图7 温度对细胞生长的影响

Fig. 7 Effect of temperature on cell growth

参考文献

- 1 陈宗莲, 侯岁稳, 俞宏渊. 除虫菊的组织培养. 云南植物研究, 1998, 20(3): 351~354
- 2 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995. 36~38
- 3 唐巍, 吴绛云. 人参悬浮细胞系的建立及其生长特性的研究. 生物技术, 1994, 4(1): 26~29
- 4 张晓东, 林延安. 苜蓿细胞悬浮培养与耐受高浓度PEG变异体的筛选. 核农学报, 1994, 8(1): 7~13
- 5 于荣敏, 赵鸿莲, 张辉等. 银杏细胞悬浮培养及银杏内酯产生的研究. 生物工程学报, 1994, 15(2): 207~210
- 6 涂艺声, 江洪如, 王碧琴. 草珊瑚细胞悬浮培养之研究. 江西科学, 1994, 12(3): 162
- 7 李春喜, 王志和, 王文林. 生物统计学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2000. 149~155