

薰衣草细胞悬浮培养体系的优化

许耀祖^{1,2,3} 王晓军^{1*} 赵民安¹ 韦彦余¹ 赵海清¹ 林侃¹

(¹中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; ²中国科学院研究生院, 北京 100830;

³浙江赐富生物技术有限公司, 杭州 310053)

摘要 采用正交设计方法对影响薰衣草悬浮细胞生长的因素进行了优化研究, 筛选了最有利于薰衣草悬浮细胞生长的培养条件: 含有 0.025 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 6-BA、40 g/L 蔗糖的 B₅ 培养基和 120 r/min 的转速, 在此条件下培养 15 天, 悬浮活细胞密度可达到 4.4 × 10⁵ 个/ml; 经过 3 个月的培养, 悬浮细胞的分化率可达到 90% 以上。通过分析薰衣草细胞对残糖的消耗规律, 探讨了蔗糖浓度影响活细胞密度的原因。

关键词 薰衣草; 细胞悬浮培养; 正交设计

薰衣草(*Lavandula*)是唇形科薰衣草属多年生半灌木, 原产于地中海, 其喜光耐旱, 适合在广袤的干旱地区种植^[1]。薰衣草是重要的化工、医药原料, 其精油广泛应用于医药、食品、饮料和加香产品等工业领域^[2,3]。目前, 薰衣草精油质量严重下降, 使得薰衣草的种植和加工业的经济效益大为降低; 新疆等干旱地区严寒的冬天, 使得薰衣草过冬必须覆土, 从而提高了生产成本。为了迅速改变这一状况, 我们从法国引进新的优良品种孟斯泰德薰衣草(*Lavandula angustifolia*, cv. *Munstead*), 建立薰衣草悬浮细胞系, 并检测细胞系的全能性, 为生物反应器快繁带有外源抗冻蛋白基因的转基因薰衣草植株和生产薰衣草精油有效成分打下基础。

薰衣草组织细胞培养国内研究的不多, 廖苏梅等^[4]进行了芽增殖培养而实现薰衣草微繁的研究, 国外学者通过器官发生途径从分化外植体如叶、茎或愈伤组织获得了多种薰衣草的再生植株^[5-7], 并对再生植株的精油含量及其组分相对含量进行了对比研究^[8,9]; 国外学者对薰衣草细胞培养研究较多: 有的利用薰衣草(*Lavandula vera* MM)细胞培养生产 Rosmarinic acid^[10-12], 有的进行了薰衣草(*Lavandula spica*)细胞培养生产色素的研究^[13]。此外, 还有利用薰衣草细胞培养生产抗氧化剂^[14]、类萜^[15]、单萜^[16]的报道。但孟斯泰德薰衣草细胞悬浮培养和薰衣草细胞系全能性检测的研究国内外尚未见报道。

1 材料与与方法

1.1 材料

孟斯泰德薰衣草为法国引进新品种, 由新疆芳

香科技股份有限公司提供。愈伤组织来源于叶片经固体培养基上多次继代诱导产生的生长旺盛、疏松易碎的组织。

1.2 细胞悬浮系的建立

取约 2 g 愈伤组织接种到盛有 40 ml 液体培养基的 100 ml 三角瓶中, 接种后置于旋转式摇床无光振荡培养, 摇床转速为 150 r/min, 温度 25 °C。约 10 天后, 将培养物用 100 目筛网过滤, 滤液稍置片刻, 待细胞或细胞团沉淀后, 倾去上部培养液, 然后接入新鲜培养液继续培养。10~15 天后, 用 200 目筛网过滤培养物, 滤液用同样的方法处理, 继续进行培养, 如此可得分散均一的细胞悬浮液。

1.3 正交实验

以悬浮培养 15 天的活细胞密度为考察指标, 选用 L₁₆(4⁵) 设计进行薰衣草细胞悬浮培养条件的优选^[17](表 1)。根据设计安排 16 组实验, 每组接种 2 瓶, 每组重复 2 次, 结果取平均值。

表 1 L₁₆(4⁵) 因子水平表

| 水平 | A | B | C | D | E |
|----|-------------|------------|----------------|----------|------------|
| | 2,4-D(mg/L) | 6-BA(mg/L) | 培养基 | 蔗糖 (g/L) | 转速 (r/min) |
| 1 | 0.01 | 0.1 | N ₆ | 20 | 80 |
| 2 | 0.025 | 0.5 | B ₅ | 30 | 100 |
| 3 | 0.05 | 1.0 | MS | 40 | 120 |
| 4 | 0.1 | 2.0 | SH | 50 | 150 |

收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-05-24

中国科学院西部行动计划资助项目(No.KGCX2-SW-506)

* 通讯作者。Tel: 0991-3813610, Fax: 0991-3838957, E-mail:

Mrxu0106@yahoo.com.cn

1.4 (活)细胞密度和活细胞率的测定

(活)细胞密度测定采用上海医用光学仪器厂生产的血球计数板, (活)细胞密度(个/ml)=25个方格(活)细胞总数 $\times 10^4$, 重复3次, 取平均值。用亚甲兰检查细胞活性, 方法是取0.5%亚甲兰生理盐水溶液与细胞悬浮液以1:2混合, 10 min后取适量混合液置于血球计数板上计数, 可以染色的为活细胞, 活细胞率=(活细胞数/所有观察总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.5 悬浮细胞的分化

悬浮细胞每个月继代一次, 培养3个月, 过80目的筛子, 取筛上物, 接入分化培养基MS+0.2 mg/L IAA, 30天, 统计分化率, 每次接30个外植体, 重复2次, 结果取平均值。

1.6 培养液中残糖的测定

蒽酮法^[18], 每次用移液器在超净台取样1 ml。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的诱导和继代

取薰衣草幼嫩叶片, 75%酒精表面灭菌25 s, 0.1%升汞溶液浸泡3 min, 然后用无菌水冲洗至干净, 切成0.5 cm²左右的小片状, 叶面朝上, 接种于MS+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA, 约25天, 黄褐色的愈伤组织可覆盖整个外植体。在培养基MS+0.05 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA上继代, 经过3~5代(每代25~30天), 可以发现白色、黄色和红色3种新鲜愈伤组织。白色愈伤组织结构松软, 色泽淡白, 水渍状, 易褐化, 而黄色和红色愈伤组织在培养过程中逐渐变得结构致密, 质地略硬。

表2 愈伤组织对细胞密度和活细胞率的影响

| 愈伤组织类型 | 培养时间(天) | 细胞密度(10^5 个/ml) | 活细胞率(%) |
|--------|---------|--------------------|---------|
| 白色愈伤组织 | 15 | 5.1 | 42 |
| 黄色愈伤组织 | 15 | 4.2 | 95 |
| 红色愈伤组织 | 15 | 3.7 | 91 |

2.2 悬浮细胞系的建立及其影响因素

2.2.1 愈伤组织对悬浮细胞系建立的影响 分别以白色、黄色和红色种愈伤组织为接种材料, 接入液体培养基MS+0.05 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA, 在150 r/min的转速下, 建立细胞悬浮培养体系。细胞悬浮培养15天, 取样, 测定细胞密度和活细胞率, 结果见表2。

在悬浮系建立过程中发现, 白色愈伤组织较黄色或红色愈伤组织更易建立悬浮细胞系, 2~3天, 培养液即变浑浊, 而且悬浮系比较分散均一, 但是白色愈伤组织的细胞很容易褐化, 培养约10天, 培养液的颜色即变深变褐, 培养约20天, 培养液变黑, 由表2可知, 培养15天, 其悬浮系的细胞密度是 5.1×10^5 , 远高于其他悬浮系的细胞密度, 但细胞死亡率却高达58%, 远高于其他悬浮系的5%和9%。黄色愈伤组织所建立的悬浮系的细胞密度较高, 活细胞率也较高, 但红色愈伤组织转移到分化培养基上(同上), 直接分化完整的植株, 分化率可达80%, 而黄色愈伤系分化率(15%)远低于红色愈伤组织。红色愈伤组织接种于液体培养基, 3~5天, 即可得分散均一、生长较快的悬浮培养体系。综合考虑, 红色愈伤组织为建立悬浮系的最佳接种材料。

2.2.2 不同影响因子对悬浮细胞系建立的影响

表3 正交实验结果

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 1.8 | 3.1 | 2.5 | 0.9 | 4.1 | 3.3 | 3.5 | 3.0 | 1.2 | 3.0 | 1.9 | 2.3 | 2.7 | 1.0 | 1.3 | 2.8 |

表下行数值为活细胞密度, 单位是 10^5 个/ml。

表4 不同活细胞密度的极差分析

| K _{ij} | A | B | C | D | E |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| K ₁ | 8.3×10^5 | 9.8×10^5 | 9.8×10^5 | 8.6×10^5 | 9.1×10^5 |
| K ₂ | 13.9×10^5 | 10.4×10^5 | 10.8×10^5 | 10.7×10^5 | 10.6×10^5 |
| K ₃ | 8.4×10^5 | 9.2×10^5 | 7.7×10^5 | 12.4×10^5 | 10.8×10^5 |
| K ₄ | 7.8×10^5 | 9.0×10^5 | 10.1×10^5 | 6.7×10^5 | 7.9×10^5 |
| X ₁ | 2.1×10^5 | 2.5×10^5 | 2.5×10^5 | 2.1×10^5 | 2.3×10^5 |
| X ₂ | 3.5×10^5 | 2.6×10^5 | 2.7×10^5 | 2.7×10^5 | 2.7×10^5 |
| X ₃ | 2.1×10^5 | 2.3×10^5 | 1.9×10^5 | 3.1×10^5 | 2.7×10^5 |
| X ₄ | 1.9×10^5 | 2.3×10^5 | 2.5×10^5 | 1.7×10^5 | 2.0×10^5 |
| R | 1.6×10^5 | 0.3×10^5 | 0.8×10^5 | 1.4×10^5 | 0.7×10^5 |

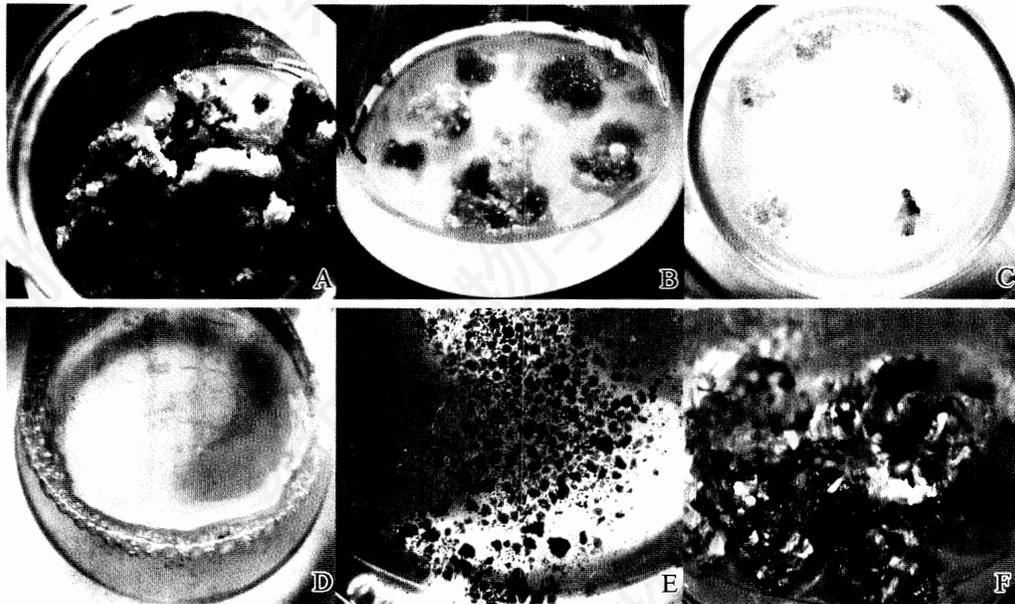


图1 薰衣草悬浮细胞系的建立及分化

A: 薰衣草红色愈伤组织; B: 薰衣草黄色愈伤组织; C: 薰衣草白色愈伤组织; D: 薰衣草悬浮细胞系; E: 生长3个月而形成的薰衣草细胞团聚体; F: 薰衣草细胞团聚体直接分化出完整植株。

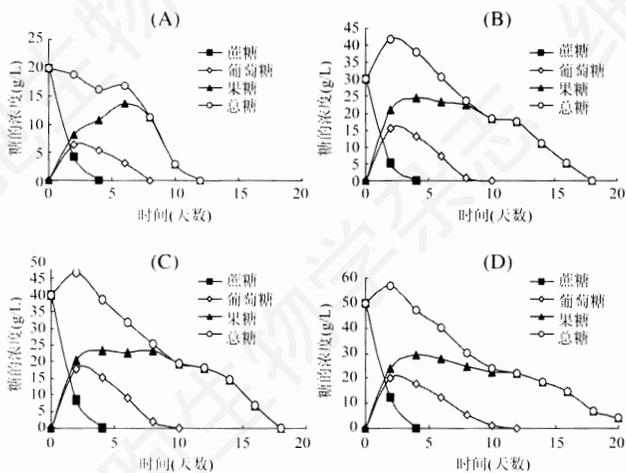


图2 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养细胞培养基中残糖的变化曲线

A: 20 g/L 蔗糖; B: 30 g/L 蔗糖; C: 40 g/L 蔗糖; D: 50 g/L 蔗糖。

按正交表的因素、水平组合进行统计, 得到16组活细胞密度(表3), 分别对16种处理的活细胞密度做极差分析, 结果见表4。

从表4可以看出, A因子极差最大, D因子次之, 再次是C因子和E因子, B因子最小。这反映2,4-D对活细胞密度影响最大, 其次是蔗糖, 再次是培养基和转速, 6-BA影响最小, 基本上可以忽略。考察各因子水平均值X发现, A因子第2水

平、B因子第2水平、C因子第2水平、D因子第3水平、E因子第3水平最大, 故细胞悬浮培养最佳条件组合为含有0.025 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 6-BA、40 g/L蔗糖的B₅培养基和120 r/min的转速。以此组合进行细胞悬浮培养, 15天后统计, 活细胞密度可达4.4 × 10⁵ 个/ml。

2.3 悬浮细胞系的分化

在优化条件下经过3个月的培养, 悬浮细胞不断分裂, 形成较大的细胞团聚体。细胞团聚体转入分化培养基, 其表面直接分化出完整的植株, 分化率达90%以上, 高于红色愈伤组织的分化率。薰衣草悬浮系生长快, 分力能力强, 这些充分说明了细胞悬浮培养体系(图1)的优化是成功的。

2.4 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养薰衣草细胞对培养液中残糖的消耗规律

培养液中的蔗糖是通过植物细胞壁上的转化酶, 在微酸性环境下迅速被分解为等分子量的果糖和葡萄糖, 培养细胞优先吸收葡萄糖, 再利用果糖。从图2的不同蔗糖质量浓度下残糖的消耗规律均可以看出这一点, 20 g/L蔗糖不足以支持薰衣草细胞的生长, 表现在对数生长期可利用的单糖浓度已经很低, 在对数生长期结束前糖类已经完全耗尽; 30 g/L、40 g/L蔗糖基本上可以满足薰衣草细胞生长的需求, 而以40 g/L蔗糖为好; 50 g/L

蔗糖已过量, 对数生长期结束时尚有 8.7% 的总糖残留, 从而表现出基质抑制效应, 使得活细胞密度最小。这些与表 4 的结论是一致的。

参考文献 (References)

- [1] 裴 鉴等。中国植物志, 第 65 卷, 2 分册, 北京: 科学出版社, 1979, 248
- [2] 陈守良等。中国经济植物志, 北京: 科学出版社, 1961, 1450
- [3] 解成喜等。新疆大学学报(自然科学版), 2002, 19: 294
- [4] 廖苏梅等。植物生理学通讯, 2004, 40: 336
- [5] Dias MC *et al.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 68: 99
- [6] Tsuru M *et al.* *Sci Hortic*, 2000, 86: 81
- [7] Tsuru M *et al.* *Sci Hortic*, 1999, 81: 331
- [8] Tsuru M *et al.* *Sci Hortic*, 2001, 88: 309
- [9] Sudria C *et al.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 58: 177
- [10] Georgiev M *et al.* *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 855
- [11] Pavlov A *et al.* *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, 17: 417
- [12] Ilieva M *et al.* *World J Microbiol Biotechnol*, 1999, 15: 711
- [13] Trejo-Tapia G *et al.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 72: 7
- [14] Kovatcheva EG *et al.* *Food Chem*, 2001, 72: 295
- [15] Banthorpe DV *et al.* *Phytochemistry*, 1995, 40: 83
- [16] Lappin GJ. *Phytochemistry*, 1987, 26: 995
- [17] 郑应熙。分析化学中的数理统计方法, 北京: 高等教育出版社, 1982, 180
- [18] 薛应龙。植物生理学实验手册, 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 134

The Optimization of Cell Suspending Culture Protocol of *Lavandula angustifolia*, cv. *Munstead*

Yao-Zu Xu^{1,2,3}, Xiao-Jun Wang^{1*}, Min-An Zhao¹, Yan-Yu Wei¹, Hai-Qing Zhao¹, Kan Lin¹

(¹Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100830, China; ³Zhejiang CIFU Biotechnology INC, Hangzhou 310053, China)

Abstract By the orthogonality design, the factors influencing suspension cells growth of *L.angustifolia* were studied, and best culture conditions which were B₅ media supplemented with 40 g/L sucrose, 0.025 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 6-BA and the rotating speed of 120 r/min were sifted. After 15 days of culture, the density of surviving cells could reach 4.4×10⁵ cell/ml, and differentiation rate of suspension cells could surpass 90% after 3 months of suspension culture. The cause of effects of sucrose concentration on the density of surviving cells was discussed through the analysis of the consumption rule of surplus sucrose.

Key words *Lavandula angustifolia*, cv. *Munstead*; cell suspension culture; orthogonality design

Received: January 17, 2005 Accepted: May 24, 2005

This work was supported by the West Action Program of Chinese Academy of Sciences (No.KGCX2-SW-506)

*Corresponding author. Tel: 86-991-3813610, Fax: 86-991-3838957, E-mail: Mrxu0106@yahoo.com.cn