

野生唐古特白刺悬浮细胞系的建立及生长特性

倪建伟^{1,2}, 魏琦², 杨秀艳², 许秀玉³,
武海雯², 张华新^{2*}, 刘涛²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 国家林业局盐碱地研究中心, 北京 100091;
3. 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要:以野生唐古特白刺的茎段、叶片为外植体,研究了 NaClO 对外植体的消毒效果和激素 2,4-D、NAA 和 6-BA 对愈伤组织诱导及愈伤组织形态的影响,并利用疏松型愈伤组织建立了白刺悬浮细胞系,对其生长特征进行了分析。结果表明:对茎段和叶片用 2% 的 NaClO 消毒 10 min 最适宜,时间过长或过短均会影响成活率;3 种激素对愈伤组织的相对生长量和形态均有影响,其中,2,4-D 是主要影响因子,且茎段诱导出的愈伤组织相对生长量比叶片的高;根据愈伤组织的生长速度和形态,适宜用浅黄色疏松型愈伤组织构建唐古特白刺悬浮细胞系,最佳试验组合为 MS + 2,4-D 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.4 mg · L⁻¹,最佳继代接种量为 7.5 mL 母液,生长曲线呈“S”型,培养第 7 天细胞分裂指数达最大值(5.1%),培养第 3 天细胞活力最强(吸光值为 0.69),存活率在细胞生长延迟期和稳定期较对数期下降略快,但均保持在 84%~93% 间。

关键词:唐古特白刺;愈伤组织;悬浮细胞;细胞培养;生长特性

中图分类号:S722.3⁺⁷

文献标识码:A

Establishment of Cell Suspension Culture and Growth Characteristics of Wild *Nitraria tangutorum*

NI Jian-wei^{1,2}, WEI Qi², YANG Xiu-yan², XU Xiu-yu³, WU Hai-wen², ZHANG Hua-xin², LIU Tao²

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Research Center of Saline and Alkali Land of State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: Taking stems and leaves of wild *Nitraria tangutorum* Bobr. as explants to study the disinfectant effects by NaClO on explants and the effects of 2,4-D, NAA and 6-BA on callus induction and morphology. The callus morphology was analyzed and cell suspension systems were established with the loose type callus, its growth characteristics were observed. The results show that the best way of disinfection of explants was 10 minutes with NaClO, the longer or shorter the sterilization time, the lower the survival rate. Three hormones had effects on relative growth and morphology of callus and the 2,4-D was a major factor, the relative growth rate of callus from stem was higher than that of leaves. To be confirmed by callus growth rate and morphological characteristics, cultured on MS medium containing 2,4-D 1.5 mg · L⁻¹, NAA 0.2 mg · L⁻¹ and 6-BA 0.4 mg · L⁻¹ was the optimum treatment combination for the establishment of *N. tangutorum* suspension cell lines. The calluses were loose type with light yellow, and the best inoculation dosage was 7.5 mL mother liquor. Under such condition, the cells grew in an ‘S’ curve.

收稿日期:2014-08-26

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(CAFYBB2012009;CAFYBB2011005-5)

作者简介:倪建伟,河北邢台人,从事耐盐碱植物资源利用等方面研究。

* 通讯作者:研究员,博士生导师,从事耐盐碱植物遗传育种方面的研究。

The cell mitotic index reached the maximum value of 5.1% at the seventh day, at the third day of cultured the cell got the strongest activity and the light absorption value was 0.69. The survival rate in the lag phase and stationary phase decreased slightly faster than logarithmic phase, but maintained between 84% - 93%.

Key words: *Nitraria tangutorum*. ; callus; suspension cells; cell culture; growth characteristics

白刺属(*Nitraria* L.)植物隶属于蒺藜科(Zygo-phylaceae),是多分枝、耐盐碱、抗风蚀、耐沙埋的旱生型低矮灌木,是荒漠、半荒漠和盐渍化土地上的重要建群种或优势种。许多研究者已从系统学、解剖学、生态防护、快繁优育、营养利用等方面对白刺属植物进行了研究^[1-4],做出了突出的贡献。唐古特白刺(*Nitraria tangutorum* Bobr.)是我国特有白刺种,具有很强的耐盐抗旱能力,其枝条、叶片和浆果中富含多种氨基酸、矿物元素和其他活性物质,具有较高的药用价值,是耐抗性研究的良好材料,对其资源开发利用具有广阔的前景^[3, 5-9]。

在组织培养方面,何正伦^[10]在早期就研究了唐古特白刺离体培养技术,王尚德等^[11]、张红晓等^[12]对唐古特白刺的愈伤诱导和腋芽增殖进行了研究,发现其植株再生困难,李代丽^[13]利用唐古特白刺组培苗研究了诱导愈伤组织过程中外源激素对内源激素含量的影响,Yang等^[14]研究了NaCl胁迫对唐古特白刺愈伤组织的生理影响。纵观前人的研究发现,不同激素对不同来源(大田或温室植株)及不同组织(根、茎、叶、胚等)外植体愈伤组织的生长和形态诱导均有影响,因此,要根据对愈伤组织的利用目的,筛选出适宜的诱导条件,培养特定形态的愈伤组织。近年来,除利用愈伤组织获得再生植株外,构建良好的悬浮细胞系已备受关注。悬浮细胞因其分散性好,生长速度快,重复性好,易于控制而被广泛应用于植物生理生化、遗传发育、次生代谢等研究中,目前已在红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)、银杏(*Ginkgo biloba* Linn.)、人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)、葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)、长春花(*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don)等多种植物^[15-19]中实现了悬浮体系的构建,为活性物质的合成、代谢途径的转变、耐抗性的机理等研究提供了优良的材料;而对白刺属植物悬浮细胞体系的建立及生长特性研究尚未见报道。因此,利用白刺愈伤组织建立稳定的悬浮细胞系,并进一步研究悬浮细胞的生长特性,对研究白刺的遗传转化、体细胞胚胎发生和利用细胞培养产生次生代谢物等提供了优良的试验材料,对后续研究将有明显的促进作用^[20]。

本研究以野生唐古特白刺的茎段和叶片为试验材料,以次氯酸钠(NaClO)为消毒剂,以2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)和6-苄基腺嘌呤(6-BA)作为外源激素,对白刺愈伤组织的相对生长量和形态进行测定和观察,同时筛选适宜的愈伤组织和初始接种量,构建稳定、快速生长的白刺悬浮细胞系,并对细胞生长曲线、细胞分裂指数和细胞活力等生长特性进行测定和分析,为今后利用白刺悬浮细胞系开展细胞、分子等水平的研究提供试验材料和科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本实验所用材料均为野生唐古特白刺,于2012年9月23—25日午后(13:00—17:00)采自甘肃省张掖市高台县碱洼滩地区(39°33'N,99°55'E)。当地为大陆沙漠干旱型气候,年均降水量103 mm;采集地为沙地,形成白刺沙包;生境植物有细枝盐爪爪(*Kalidium gracile* Fenzl)、碱篷(*Suaeda glauca* Bunge)、补血草(*Limonium sinense* (Girard) Kuntze)等。随机选取不少于10株、生长旺盛的唐古特白刺,剪取具有当年新生生长旺盛的枝条及完全展开的功能叶片为材料,置于自封袋内,标注采集信息,置于冰袋箱中低温保存。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 将白刺嫩枝条剪成约5~6 cm长的小段,用洗涤液振荡5 min,自来水冲洗45 min,70%酒精浸泡30 s,再用现配的2%的次氯酸钠(NaClO)分别消毒处理8、10、12、15 min,之后用无菌水清洗3~5次。将叶片和枝条(剪成约1 cm左右)均用无菌手术刀划伤,横向平放于含MS固体培养基(MS固体培养基的蔗糖含量 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值5.8)的培养皿上,每个培养皿接种4个外植体,5个培养皿为1组,每组4次重复,25℃培养10 d。每天及时观察,出现污染个体迅速转移未污染个体到新培养皿中继续培养。以外植体端口或划伤处有膨大现象、颜色为绿或浅绿色的个体判为成活个体,未见膨大、颜色发黑或褐色为未成活

个体。观察外植体的污染及成活个数,计算污染率和成活率。

$$\text{污染率} = \text{污染个数} / \text{接种总数} \times 100\%$$

$$\text{成活率} = \text{成活个数} / \text{接种总数} \times 100\%$$

1.2.2 愈伤组织的诱导 选无污染茎段、叶片为试验材料,以 MS 为基本培养基(蔗糖含量 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 5.8, 温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$),以 2,4-D、6-BA、NAA 为外源激素,采用正交试验设计 $L_{16}(4^5)$ (表 1),其中,每个培养皿接种 6 个外植体,每组 6 次重复,共计 36 个;不添加外源激素为对照,以观察其自然长势,30 d 后统计愈伤组织的相对生长量。愈伤诱导前称量外植体的质量为 W_1 ,培养后愈伤组织的鲜质量为 W_2 ,愈伤组织相对生长量计算公式如下:

$$\text{愈伤组织相对生长量} = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100\%$$

表 1 正交试验因素及水平 $L_{16}(4^5)$

水平	因素(外源激素浓度)/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	2,4-D	NAA	6-BA
1	0.5	0.0	0.0
2	1.0	0.2	0.2
3	1.5	0.4	0.4
4	2.0	0.6	0.6

1.3 白刺细胞悬浮体系的建立

1.3.1 白刺悬浮细胞体系的初步建立 根据不同激素诱导的愈伤组织的生长和形态状态,选取生长良好且质地松散的愈伤组织约 5 g,接种于含 30 mL MS 液体培养基(激素与诱导该愈伤组织的相同)的 100 mL 锥形瓶中,置于摇床上黑暗培养,转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 $26 \sim 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。每 14 d 继代 1 次,并用过滤筛去除颗粒状愈伤组织,继代 3 次后得到白刺悬浮细胞培养系,用倒置显微镜(XD-202)观察细胞形态。

1.3.2 初始接种量的筛选 分别吸取 2.5、5、7.5、10 mL 上述待继代悬浮细胞液,接种到含有 30 mL MS 液体培养基的 100 mL 锥形瓶中,置于摇床上黑暗培养,转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 $26 \sim 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。接种后每天取样 1 次,每次 3 个重复,测定悬浮细胞液中细胞鲜质量(尼龙网抽滤后称质量)。14 d 后绘制细胞生长曲线。

1.3.3 细胞活力的测定 采用 TTC 法测定细胞活力^[21]。选取 1.3.2 结果中最佳接种量继代培养,每天取样 1 次,平行 3 组试验,连续取 14 次。将悬浮细胞液抽虑,每个试管分别加入 500 mg(鲜质量)悬

浮细胞,加 2.5 mL 0.6% 的 TTC 溶液和 2.5 mL 磷酸缓冲液(pH 值 7.2~7.4)混匀, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下黑暗处理 18~20 h。除去上清液并用蒸馏水洗涤细胞 3 次,加入 5 mL 95% 的乙醇溶液, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下反应 30 min,室温下洗至细胞无色。取上清液在分光光度计上测定 485 nm 下的吸光值(Abs),吸光值和细胞的活力成正比。

1.3.4 细胞分裂指数的测定 采用醋酸洋红染色法测定细胞分裂指数。细胞继代培养过程中,每天取样 1 次,平行 3 组试验,连续取 14 次,每次计数 300 个以上细胞,镜检处于分裂期的细胞数量,计算分裂指数,并绘制分裂指数曲线。

$$\text{分裂指数} = \text{分裂期细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

1.3.5 细胞存活率的测定 采用中性红染色法测定细胞存活率。细胞继代培养过程中,每天取样 1 次,平行 3 组试验,连续取 14 次,每次计数 300 个以上细胞,镜检存活细胞,其中,活细胞仅液泡呈淡红色,死细胞细胞核被染成红色,计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = \text{活细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

1.4 数据处理与分析

利用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 进行数据处理、图形绘制和统计分析,采用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 NaClO 对茎段和叶片的消毒效果

表 2 表明:随着消毒时间的增加,外植体污染率降低,对茎段和叶片消毒 10 min 的效果均最好,成活率分别达 65.00% 和 63.75%。消毒时间继续增加,成活率反而降低,表明消毒液对外植体伤害也逐步增大。消毒 15 min 时,部分外植体颜色变褐且无膨大趋势,茎和叶的成活率仅为 31.25% 和 23.75%。消毒时间过短,消毒不彻底,污染个数增多;消毒时间过长,植物材料受损,成活率降低,宜选用消毒 10 min。

表 2 外植体消毒试验结果

外植体	处理时间/min	污染率/%	成活率/%
茎段	8	65.00a	35.00bc
	10	35.00b	65.00a
	12	30.00bc	58.75a
	15	12.50d	31.25bc
叶片	8	56.25a	43.75b
	10	36.25b	63.75a
	12	25.00bc	58.75a
	15	20.00cd	23.75c

注:同列中相同外植体的不同字母表示在 0.05 水平差异显著($P < 0.05$)。

2.2 不同外源激素对茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

不同配比的外源激素对白刺茎段和叶片愈伤组织的诱导有明显的差异,对照(不加任何外源激素)的茎段和叶片呈吸水膨大状态,并在划伤处有少许愈伤组织出现,但不会继续生长;而添加激素诱导的外植体形态变化明显,茎段和叶片的愈伤组织快速生长。由表3可知:3种不同激素对白刺外植体愈伤组织的相对生长量均有影响。由极差(R 值)分析结果(表4)可知:茎段和叶片愈伤组织相对生长量的 R 值均为2,4-D处理的最大,分别为21.7、15.0,是主要影响因子;其次是NAA, R 值分别为6.2、7.0;6-BA的最小, R 值分别为3.0、6.0。由 k 值确定茎段愈伤组织诱导外源激素浓度的最佳组合为:2,4-D $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $(0.2 \sim 0.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;叶片愈伤组织诱导最佳外源激素浓度组合为:2,4-D $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由表3、4可知:2,4-D、NAA对茎段和叶片愈伤组织相对生长量的影响均达显著水平($P < 0.05$),且在相同外源激素处理下,茎段愈伤组织的相对生长量大于叶片,即茎段诱导愈伤组织的生长速度较快。

表3 外源激素对不同外植体愈伤组织诱导试验结果

处理	外源激素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			茎愈伤组织 相对生长量/%	叶愈伤组织 相对生长量/%
	2,4-D	NAA	6-BA		
1	0.5	0.0	0.0	32h	30g
2	0.5	0.2	0.2	35gh	34g
3	0.5	0.4	0.4	37fg	35fg
4	0.5	0.6	0.6	41fg	40ef
5	1.0	0.0	0.4	47e	42de
6	1.0	0.2	0.6	51de	54a
7	1.0	0.4	0.0	48e	47bcd
8	1.0	0.6	0.2	56c	51ab
9	1.5	0.0	0.6	52cde	49abc
10	1.5	0.2	0.4	61ab	54a
11	1.5	0.4	0.2	62ab	48bc
12	1.5	0.6	0.0	57bc	48bc
13	2.0	0.0	0.2	48e	40ef
14	2.0	0.2	0.0	52cde	45cde
15	2.0	0.4	0.6	57bc	51ab
16	2.0	0.6	0.4	55cd	50abc

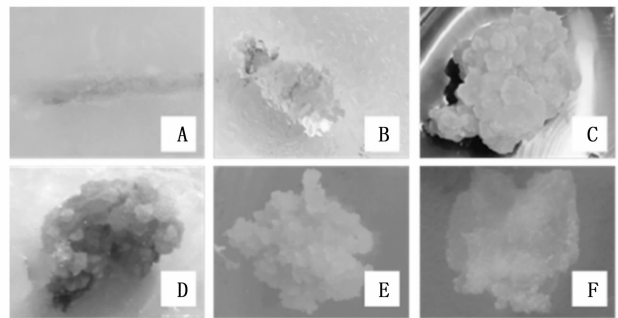
注:同列中不同字母表示在0.05水平上差异显著。

表4 正交试验极差分析结果

项目	茎段愈伤相对生长量/%			叶片愈伤相对生长量/%		
	2,4-D	NAA	6-BA	2,4-D	NAA	6-BA
k_1	36.3	44.8	47.3	34.8	40.3	42.5
k_2	48.5	49.8	50.3	48.5	46.8	43.3
k_3	58.0	51.0	50.0	49.8	45.3	45.3
k_4	53.0	47.3	50.3	46.5	47.3	48.5
R (极差)	21.7	6.2	3.0	15.0	7.0	6.0

2.3 唐古特白刺愈伤组织的形态分析

不同激素组合诱导出多种形态的愈伤组织。培养1周后,在激素的刺激下,茎段和叶片自划伤处开始明显膨大,诱导出愈伤组织,并逐步延伸至其他部位(图1A、B)。继续培养,愈伤组织不断增大,继代培养3次(每次培养30 d),愈伤组织形态发生明显变化。按照愈伤组织的结构形态基本可以分为结构致密型和疏松型两大类型^[25],其中,结构致密型表面呈颗粒状且松脆,镊子一夹即碎,有的色泽较亮,呈浅绿色,生长速度较快,具有良好的分化潜力(图1C),处理6、9多见此形态;有的色泽暗淡,黄褐色,生长速度较慢,具有褐化的倾向(图1D),处理4、8多见此形态。结构疏松型,其表面松软,色泽亮丽,有的浅黄色,生长速度快,宜用于悬浮培养(图1E),处理10、15多见此形态;有的呈乳白色,水渍状,生长缓慢(图1F),处理7、14多见此形态。



A:茎段诱导愈伤组织;B:叶片诱导愈伤组织;C:浅绿色致密型;
D:黄褐色致密型;E:浅黄色疏松型;F:乳白色疏松型

图1 唐古特白刺愈伤组织的形态观察

2.4 唐古特白刺悬浮细胞培养中的生长特性

综合考虑愈伤组织生长速度及形态结构,选取枝条产生的浅黄色疏松型愈伤组织(图1E)进行细胞培养,MS液体培养基(蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)为基本培养基,激素为2,4-D $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,pH值5.8,温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,黑暗培养,培养过程中松散状愈伤组织在摇晃中逐渐形成单细胞或小细胞团,多次继代后形成白刺悬浮细胞系(图2)。

2.4.1 唐古特白刺悬浮细胞培养中接种量对细胞生长的影响 图3表明:白刺悬浮细胞的生长曲线基本呈“S”形,且接种量不同曲线弯曲程度不同,其中,接种母液量为10 mL时,细胞自第3天快速进入对数生长期,自第7天开始进入稳定期,11 d后悬浮细胞液细胞量达到 $0.74 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,和初始接种母

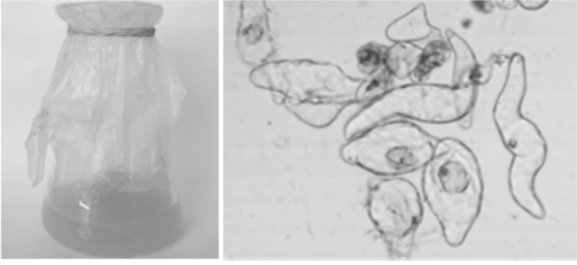


图2 白刺悬浮细胞系及细胞形态

液浓度($0.73 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)相当;接种量为 7.5 mL 母液时,细胞自第5天进入对数生长期,第10天进入稳定期;接种量为 5.0 mL 时,细胞自第6天进入对数生长期,第11天进入稳定期;接种量为 2.5 mL ,细胞增殖速度明显变慢,基本处于停滞状态。由此表明,适量的接种量对悬浮细胞的增殖有很大的影响。当接种量较大时,易形成细胞团,分散性降低,悬浮液浑浊,接种量较低又不利用细胞生长。综合考虑,宜采用 7.5 mL 的母液量来继代培养。

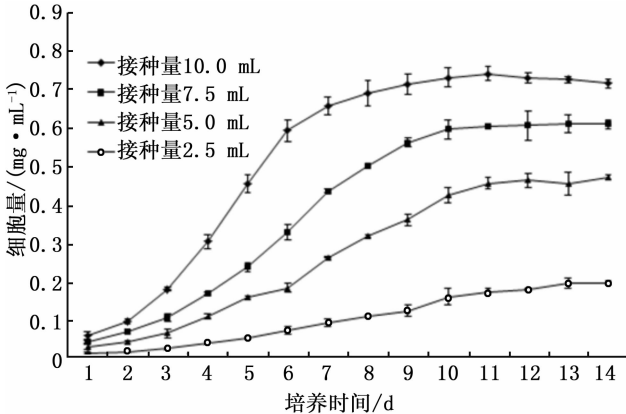


图3 唐古特白刺悬浮细胞的接种量对细胞生长的影响

2.4.2 唐古特白刺悬浮细胞培养中细胞分裂指数的变化 采用接种量为 7.5 mL 母液继代培养,白刺悬浮细胞的分裂指数随培养时间的变化结果(图4)表明:分裂指数随培养时间呈先增加后降低的趋势;在接种后第2天出现细胞分裂,之后细胞分裂指数迅速增高,并在第7天达到最高值(5.1%),随后细胞分裂指数迅速下降,从第10天开始下降速度减慢,细胞分裂指数趋于平衡。

2.4.3 唐古特白刺悬浮细胞培养中细胞活力与存活率的变化 白刺悬浮细胞吸光值随培养时间的变化结果(图5)表明:白刺细胞接种1 d后,吸光值迅速增加,并在第3天达到最大值(0.69),之后吸光值逐渐降低,并趋于平衡,表明白刺悬浮细胞的细胞活力随培养时间呈先增加后降低的趋势。细胞接种初

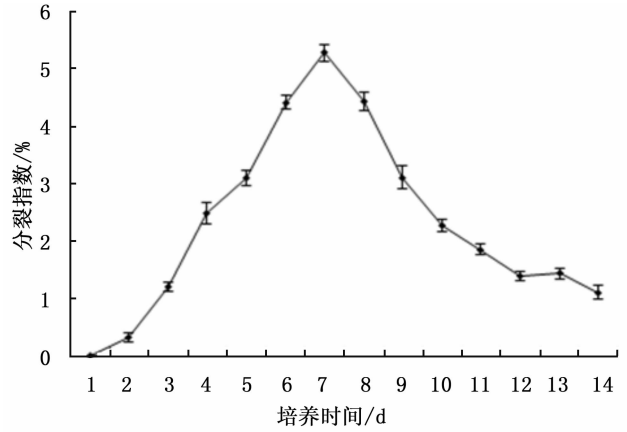


图4 唐古特白刺悬浮细胞分裂指数随培养时间的变化

期处于生长延迟期,为细胞分裂做准备,如合成DNA等物质,因此,细胞活力迅速增强;而在指数生长期和稳定期细胞活力逐渐减弱。在整个培养期间,白刺悬浮细胞的存活率保持在 $84\% \sim 93\%$ (图6)。与对数生长期细胞相比,在细胞生长延迟期和稳定期,细胞的存活率下降略快,可能与细胞或因适应新环境或因细胞数量较多营养物质相对缺少有关,有待进一步研究。

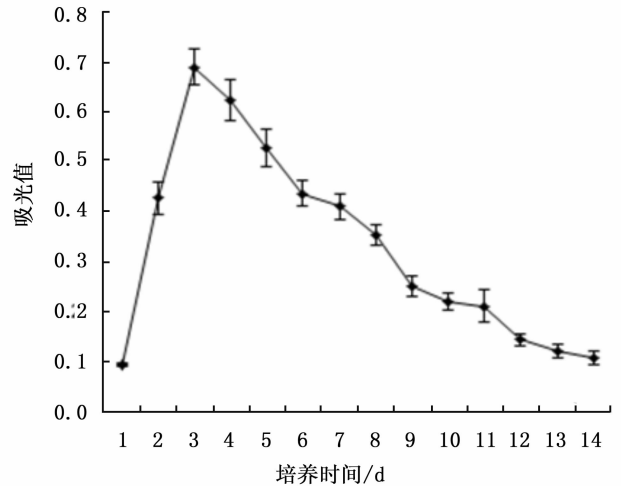


图5 唐古特白刺悬浮细胞吸光值随培养时间的变化

3 结论与讨论

本文研究了野生唐古特白刺外植体的消毒、愈伤组织的诱导和悬浮细胞系的构建过程,并对悬浮细胞系在培养周期中的生长特征进行了分析。对外植体的消毒结果表明,野外采集的外植体消毒效果远低于温室材料^[22],这与野外环境菌种复杂,且白刺茎、叶部位长有细小的绒毛增加消毒难度有关。消毒时间短,除菌效果差;消毒时间长,对材料有损

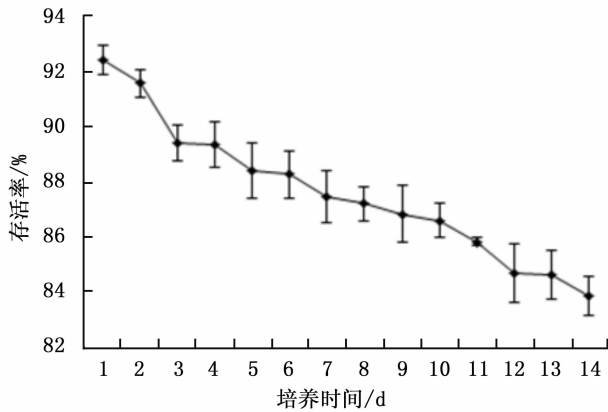


图6 唐古特白刺悬浮细胞存活率随培养时间的变化

伤。本研究采用2%的NaClO消毒,对茎段和叶片的消毒时间以10 min为宜,成活率分别为65.00%和63.75%。与王尚德^[11]、范小峰等^[23]对白刺外植体消毒效果对比可知,不同的消毒剂、浓度和消毒时间对消毒效果均有影响。对白刺愈伤组织诱导的研究发现,2,4-D、NAA和6-BA 3种激素对其相对生长量均有显著的影响($P < 0.05$),其中,2,4-D影响最明显(R 值最大);同时发现茎段较叶片更容易产生愈伤,且相对生长速度更快,这和王尚德^[11]、李代丽等^[13]的研究一致。白刺茎段中的维管束远比叶片中的丰富,而愈伤组织的诱导是从维管束开始启动的^[11]。王海波等^[24]认为,在继代培养过程中,可适度变换2,4-D的浓度以调节愈伤组织的状态。NAA对愈伤组织的诱导效果不及2,4-D,但它与6-BA在一定程度上影响着愈伤组织的形态和质量^[25]。形成的愈伤组织按其形态可分为结构致密型和结构疏松型,致密型愈伤组织更容易分化,适宜建立再生体系;疏松型愈伤组织是构建悬浮细胞体系的最佳材料^[25]。

本研究选取疏松型生长速度快的愈伤组织构建了稳定、快速生长的唐古特白刺细胞悬浮系,在继代过程中其生长曲线呈“S”型,且有明显的延迟期、对数生长期和稳定期,这和文冠果(*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.)、西洋参(*Panax quinquefolius* Linn.)、红豆杉等多种植物^[26-27]悬浮细胞的生长曲线基本一致。白刺细胞生长周期与初始接种量有关,接种量大,细胞进入对数期早,可缩短继代周期,本研究中宜选取7.5 mL母液加入30 mL MS液体培养基继代培养。悬浮细胞的生长具有群聚效应,适量的细胞密度是细胞生长所需的生理环境,接种量过大或过低都会影响细胞的细胞分散性或生长速度。白刺悬

浮细胞的活力和分裂指数均呈先增加后减少的趋势,在延迟期阶段,细胞需要适应新的培养基,并且细胞进行着DNA、RNA的复制和有关蛋白质的合成^[28],细胞活力较大,在第3天达到最高值,做原生质体研究时宜在此时取样。之后白刺悬浮细胞分裂指数增加,细胞数量快速增加,在第7天细胞分裂指数达到最高值5.1%,即细胞分裂比较旺盛时期,认为对细胞分裂方面的研究宜在培养7 d时取材,这较桑树(*Morus alba* Linn.)^[29]、文冠果^[26]等时间提前,可能与白刺细胞自身生长特性有关。在细胞进入稳定期之初,培养基中的细胞量趋于平衡,此时宜进行继代培养,白刺接种量在7.5 mL时,宜在第9天进行继代培养。与文冠果^[26]、红豆杉^[30]、西洋参^[27]、桑树^[29]等相比,各生长周期、分裂指数、细胞活力等均有差异,这除与植物本身增殖快慢有关外,可能还与其培养基组成、接种量、培养环境等因素有关。

从试验中可以得出,在激素为2,4-D 1.5 mg · L⁻¹、NAA 0.2 mg · L⁻¹、6-BA 0.4 mg · L⁻¹的MS液体培养基中按接种量为7.5 mL、培养9 d的继代培养,可得到稳定、快速生长的唐古特白刺悬浮细胞系。前人在对愈伤组织诱导和细胞培养影响的研究中,吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、激动素(KT)也常作为诱导因子,而各激素间及外源激素与细胞内源激素的相互影响均会影响细胞的分裂或分化,在今后的研究中有必要继续探索其他激素对细胞生长的影响。

参考文献:

- [1] 李双福,张启昌,张起超,等. 白刺属植物研究进展[J]. 北华大学学报:自然科学版,2005,6(1):78-81.
- [2] 潘晓玲,沈观冕,陈鹏. 白刺属植物的分类学及系统学研究[J]. 云南植物研究,1999,21(3):21-29.
- [3] 潘晓云,曹琴东,尉秋实,等. 白刺属的系统进化和生物多样性研究进展[J]. 中国医学生物技术应用,2002(4):1-6.
- [4] Duan J, Williams I D, Che C, et al. Tangutorine: A novel β -carboline alkaloid from *Nitraria tangutorum* [J]. Tetrahedron letters, 1999, 40(13):2593-2596.
- [5] 宋永朋,张东,林辉. 白刺果皮中原花青素的提取工艺[J]. 食品研究与开发,2012,33(8):85-88.
- [6] 任旭,陈贵林. 唐古特白刺果实提取物抗氧化活性评价[J]. 食品科学,2011,32(3):95-97.
- [7] 高海宁,李彩霞,张勇,等. 唐古特白刺果浆中原花青素提取工艺及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2010,31(10):109-112.
- [8] 刘利平,燕玲. 白刺属植物化学成分的研究现状与发展趋势

- [J]. 内蒙古农业大学学报:自然科学版,2009,30(1):316-320.
- [9] 马启慧. 耐盐碱植物白刺的开发与利用[J]. 黑龙江农业科学,2007(5):116-117.
- [10] 何正伦. 白刺的离体繁殖[J]. 甘肃林业科技,1989(2):52-53.
- [11] 王尚德. 唐古特白刺优株选择与组织培养研究[D]. 北京:北京林业大学,2005.
- [12] 张红晓,康向阳. 白刺组织培养技术的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(1):56-64.
- [13] 李代丽. 白刺愈伤组织培养中外源激素对内源激素影响的研究[D]. 北京:北京林业大学,2007.
- [14] Yang Y, Wei X, Shi R, *et al.* Salinity-induced Physiological Modification in the Callus from Halophyte *Nitraria tangutorum* Boer. [J]. Journal of plant growth regulation,2010,29(4):465-476.
- [15] Zhang C H, Mei X G, Liu L, *et al.* Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*[J]. Biotechnology Letters,2000,22(19):1561-1564.
- [16] Carrier D, Chauret N, Mancini M, *et al.* Detection of ginkgolide A in *Ginkgo biloba* cell cultures[J]. Plant cell reports,1991,10(5):256-259.
- [17] Lu M, Wong H, Teng W. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*[J]. Plant Cell Reports,2001,20(7):674-677.
- [18] 杜晓映,张振文,夏惠,等. 葡萄悬浮细胞系的建立[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(1):199-210.
- [19] Guo Z, Liu Y, Gong M, *et al.* Regulation of vinblastine biosynthesis in cell suspension cultures of *catharanthus roseus*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2013,112(1):43-54.
- [20] Namdeo A G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites; a review[J]. Pharmacognosy reviews,2007,1(1):69-79.
- [21] Towill L E, Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures[J]. Canadian Journal of Botany,1975,53(11):1097-1102.
- [22] 王晨霞. 西伯利亚白刺离体培养体系建立及试管苗耐盐性研究[D]. 内蒙古呼和浩特:内蒙古大学,2008.
- [23] 范小峰,杨颖丽,刘秀丽,等. 唐古特白刺愈伤组织诱导及再生体系的研究[J]. 西北师范大学学报:自然科学版,2009,45(2):74-77.
- [24] 王海波,魏景芳,葛亚新,等. 小麦愈伤组织状态调控与原质体培养[J]. 中国农业科学,1996,29(6):8-14.
- [25] 孙敬三,朱至清. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [26] 刘磊,顾玉红,孟坤,等. 文冠果悬浮细胞系的建立及细胞生长特性[J]. 林业科学,2010,46(9):79-83.
- [27] 闫静辉,张小兵,李亚璞,等. 西洋参悬浮细胞系的建立及其生长特性的研究[J]. 河北省科学院学报,2005,22(4):23-26,36.
- [28] 朱玉贤,李心毅. 现代分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2002.
- [29] 李勇. 桑树细胞悬浮培养的研究[D]. 山东泰安:山东农业大学,2007.
- [30] 胡风庆,任娟. 东北红豆杉细胞悬浮培养研究[J]. 辽宁大学学报:自然科学版,2002,29(3):279-282.