

皂质芦荟细胞悬浮培养初探

周晓鹿, 李思良

(北京林业大学 生物科学与技术学院 北京 100083)

摘要: 试验初步研究了皂质芦荟细胞悬浮培养过程。比较了不同基本培养基、接种量对悬浮培养过程中细胞生长量的影响。采用正交设计方法, 对影响皂质芦荟悬浮细胞生长的因素进行了优化研究。初步探讨了皂质芦荟在细胞生长周期里生理生化特性。结果表明: B5 培养基有利于细胞的增殖; 每 50 mL 培养液中加入 2 g 愈伤组织的接种量为宜; 筛选出最适激素组合为 2,4-D 3.0 mg/L + KT 0.5 mg/L, 葡萄糖 25 g/L pH 值 5.8; 皂质芦荟悬浮培养的生长周期为 25 d, 细胞增值率曲线呈 S 型; 在悬浮细胞生长前期, pH 值明显下降, 在细胞对数生长期, pH 值略有升高, 并趋于平缓; 总酚含量、POD、SOD 均出现 2 个峰值, 但出现时间不同, 其变化趋势与细胞生长趋势呈正相关, PPO 活性与细胞生长趋势呈负相关。

关键词: 皂质芦荟; 悬浮培养; 生理生化指标

中图分类号: S 682.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0188-05

芦荟 (*Aloe spp.*) 属百合科、单子叶草本植物。研究表明芦荟具有护肤美容、防晒、抗衰老、抗菌消炎、抗癌、增强机体免疫力、解毒保健及促进伤口愈合等一系列特殊功能。在芦荟各个培养过程中, 均产生不同程度的褐变现象, 导致细胞分裂和生长受到制约, 尤其在芦荟细胞悬浮培养阶段, 褐变现象极其严重。植物组织培养过程中的褐变问题已经成为影响组培成功的重要因素之一。褐变的发生与植物组织中酚类化合物的含量和多酚氧化酶 (PPO) 活性有一定关系^[1], 迄今未见芦荟培养物生长中 PPO、POD 和 SOD 活性变化规律的报道, 因此, 通过研究芦荟悬浮培养继代过程中的多酚氧化酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性和总酚含量的变化规律, 希望找到芦荟细胞悬浮阶段褐变的机理以及在继代培养中克服褐变的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

选取生长旺盛、结构疏松、状态相似的皂质芦荟愈伤组织, 作为细胞悬浮培养的材料。

1.2 方法

1.2.1 基本培养基、接种量对细胞悬浮培养的影响 选取 3 种液体培养基 MS、B5、ER, 均加入 1.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT, 水解乳蛋白 50 mg/L、葡萄糖 20 g/L, 考察

不同培养基对皂质芦荟细胞生长的影响。接种量分别选取 0.5、1.0、3.0、5.0 g, 以 B5 为基本培养基, 附加 1.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT、水解乳蛋白 50 mg/L、葡萄糖 20 g/L, 以考察接种量对皂质芦荟细胞生长情况的影响。两者培养条件均为 pH 值 5.8, 24℃, 摇床转速为 100 rpm/min 暗培养。

1.2.2 植物激素的调控 以 B5 为基本培养基, 葡萄糖 20 g/L, pH 值调至 5.8, 接种量为 3 g, 2,4-D 分别取 0.5、1.0、3.0、5.0 mg/L 4 个水平, KT 分别取 0.1、0.5 mg/L 2 个水平。

1.2.3 皂质芦荟悬浮细胞生长曲线的测定 在 150 mL 的三角瓶中先加入 20 mL 液体培养基, 每瓶接种愈伤组织 1.0 g, 放置在摇床上, 24℃ 黑暗状态下进行振荡培养, 转速为 100 rpm/min。3 d 后每瓶加入成分相同的新鲜培养基至 60 mL。每 3 d 测 1 次鲜、干重, 重复 3 次。15 d 后收获悬浮培养细胞, 继代培养时用无菌的 80 目细胞筛过滤, 弃去较大的细胞团, 选择 1 mm 大小的细胞团约 1 g 加入 60 mL 新鲜培养液重新进行振荡培养。

1.2.4 细胞悬浮培养过程中生理生化指标的测定 培养液中 pH 值的变化测定: 悬浮细胞的培养液 pH 值用 Sartorius 生产的 PB-21 型酸度计测量。在最适培养基及激素配比的基础上, 每 2 d 测 1 次培养液中的 pH 值, 重复 3 次, 共测 21 d。总酚含量的测定: 参考李焕秀^[1]的研究方法进行改进。将愈伤组织用液氮研磨后, 在分析天平上称取 0.5 g, 加入 1 mL 提取液为 50 的乙醇 (pH 3.0), 充分震荡提取后, 4℃, 12 000 r/min, 离心 15 min, 收集上清液。适当稀释后在岛津 UV-2550 型分光光度计上读取光密度值, 检测波长为 270 nm。以邻苯

第一作者简介: 周晓鹿 (1981-), 女, 辽宁鞍山人, 北京林业大学良种繁育中心在读硕士, 主要从事生物科学与技术的学习与研究。
E-mail: 1292110501@163.com.

基金项目: 国家林业局资助项目 (99-10)。

收稿日期: 2007-08-02

二酚作标准曲线, 计算每克鲜样中总酚的毫克数。标准曲线的制作: 配制浓度为 1.0 mg/mL 的邻苯二酚溶液, 分别取 0、20、40、60、80、100、120 μ L 定容至 2 mL, 震荡混匀后, 于 UV-2550 型分光光度计上 270 nm 处测定吸光值。结果表明: 浓度与其吸光值呈线性关系, 并得线性回归方程为 $y = 0.0562x - 0.0804$, 相关系数为 0.9898 (见图 1)。多酚氧化酶(PPO)的活性测定: 参见植物生理学实验^[3], 将愈伤组织用液氮研磨后, 在分析天平上称取 0.5 g, 加入 1 mL 提取液, 提取液为 0.05 mol/L, pH 值 7.0 的磷酸缓冲液, 加入 1% 的 PVP。充分震荡提取后, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 15 min, 上清液即为粗提液。在反应管里加入 1.95 mL 0.05 mol/L pH 值 5.5 磷酸缓冲液, 0.5 mL 0.1 mol/L 儿茶酚和 10 μ L 酶液, 各管于 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 迅速放入冰浴中, 立即加入 2 mL 质量分数为 2% 的三氯乙酸, 适当稀释后在岛津 UV-2550 型分光光度计上读取光密度值, 检测波长为 525 nm。每 30 s 读数 1 次, 共读 4 min。以每分钟 OD 值增加 0.01 为一个酶活性单位 (unit)。超氧化物歧化酶(SOD)的活性测定: 按 Beauchamp (1971) 所建立, Bewley 等 (1979) 改进的方法, 以抑制氮蓝四唑(NBT)光还原反应达 50% 为一个超氧化物歧化酶活力单位 ($U \cdot g^{-1}$ FW)。粗提液的制备同上。分别取 3 个试管, 一个为测定管, 另两个为对照管。用 0.05 mol/L pH 值 7.8 磷酸缓冲液、20 μ mol/L 核黄素、750 μ mol/L NBT、130 mmol/L 甲硫氨酸配制 SOD 反应液。将 2 只对照试管分别加上 3 mL 反应液, 再加入 20 μ L 磷酸缓冲液。其中一只在黑暗条件下调零, 另一只光照处理作对照。测定管也加入 3 mL 反应

液和 20 μ L 酶液, 并在光照条件下反应 3 min 后, 马上用分光光度计测定 525 nm 处的光吸收。以能抑制反应 50% 的酶量为 1 个 SOD 单位 (unit)。过氧化物酶活性 (POD) 的活性测定: 参见植物生理学实验 (朱广廉, 1990) 在过氧化物酶催化下, H_2O_2 将愈创木酚氧化成茶褐色产物。此产物在 470 nm 处有最大光吸收。粗提液的制备同上。在空白管中依次加入 1.8 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 6.5), 0.1 mL 0.1% 愈创木酚水溶液、0.1 mL 0.1% H_2O_2 溶液, 迅速混匀; 在样品管中依次加入 1.7 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 6.5)、0.1 mL 0.1% 愈创木酚水溶液、0.1 mL 过程培养液 (含过氧化物酶)、0.1 mL 0.1% H_2O_2 溶液, 快速混匀。加入 H_2O_2 30 s 后, 立即用分光光度计测定 470 nm 处的光吸收, 每隔 30 s 记录 1 次。按光吸收值每增加 0.01 所需的酶量为 1 个活力单位 U, 以每分钟的光吸收变化值, 求出样品中的过氧化物酶的活力。以每分钟内 A₄₇₀ 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位 [$U/(g \cdot min)$]。

1.3 试验数据的测定方法

悬浮培养细胞鲜、干重的测定: ①测量烘干至恒重的滤纸; ②将滤纸用水浸湿, 称量滤纸湿重; ③取出细胞液倒入放置滤纸的漏斗里, 过滤, 并抽滤多余水分, 称量鲜细胞和湿滤纸的质量; ④把细胞和滤纸同时放到 60 $^{\circ}$ C 烘箱中至恒重, 称量干细胞和干滤纸的质量。每隔 2 d 测量 1 次, 每次 3 个重复。

细胞鲜重 = 鲜细胞和湿滤纸的质量 - 湿滤纸的质量; 细胞干重 = 干细胞和干滤纸的质量 - 干滤纸的质量。

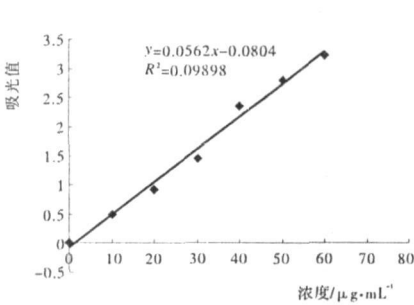


图1 邻苯二酚标准曲线

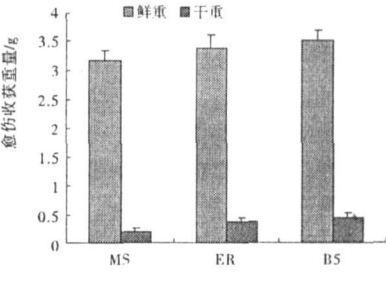


图2 不同培养基对皂质芦荟细胞培养生长的影响

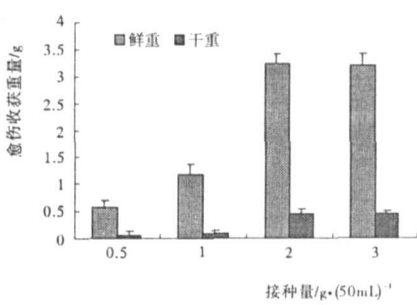


图3 不同接种量对皂质芦荟细胞生长的影响

2 结果与分析

2.1 基本培养基、接种量对细胞生长的影响

B5 培养基含有较低的铵离子, 广泛适合于愈伤组织和悬浮细胞的培养; ER 培养基是为了进行高等植物的细胞悬浮培养所特别设计的。在悬浮过程中, 无机磷酸盐消耗很快, 最终变成一个限制因子 (周立刚, 1991)。由图 2 可知, B5 较 ER、MS 更适合细胞生长。生长量最大, 鲜重为 4.108 g, 干重为 0.431 g。这应该与 B5 培养基中的特殊组分有关。

植物细胞在液体培养基中生长需要一定的细胞密度来形成细胞生长所需要的生理环境, 细胞密度低于最低有效密度时, 细胞不能正常生长 (侯学文等, 1999)。这就要求细胞生长时要有一定的接种量, 由图 3 知, 接种量不同对皂质细胞悬浮培养影响较大, 当接种量小于 2.0 g/50mL 时, 皂质细胞生长缓慢; 当接种量为 2.0 g 时, 皂质细胞增殖速度快, 培养 21 d 的细胞鲜重可达到 3.213 g, 且细胞生长状态良好, 分散性好; 当接种量 3.0 g/50mL 时, 细胞生长速度减慢, 同时褐变现象严重。

这是因为随着接种量的增加, 培养到中后期时培养基里的营养物质消耗过多, 造成培养细胞营养缺乏而死亡。故以后试验采用接种量为 2.0 g/50mL 鲜重。

2.2 不同激素及浓度对比对悬浮细胞生长的影响

在悬浮培养条件下, 细胞与营养物质接触更加充分, 悬浮培养的细胞对所提供的营养有更大的依赖性, 细胞对培养条件的要求比固体培养基上更为严格, 因此需要进一步调整植物激素的含量和配比。在植物细胞培养过程中, 主要有 5 类植物生长调节剂: 生长素类、细胞分裂素类、赤霉素、乙烯和脱落酸, 还有最近发现油菜素内酯。它们对细胞的生长和分化都有一定的影响, 最常用的主要有生长素类和细胞分裂素类, 前者促进细胞的生长, 后者促进细胞的分裂, 而且二者搭配使用效果更佳(刘春朝, 1997)。

表 1 不同激素及浓度对比对悬浮细胞生长的影响

处理	2,4-二氯苯氧乙酸 / mg · L ⁻¹	激动素 / mg · L ⁻¹	细胞鲜重 / g	细胞干重 / g
1	0.5	0.05	2.163	0.281
2	0.5	0.1	2.495	0.295
3	0.5	0.4	2.337	0.354
4	1.0	0.05	2.631	0.392
5	1.0	0.1	2.998	0.427
6	1.0	0.4	2.713	0.405
7	3.0	0.05	3.114	0.442
8	3.0	0.1	3.622	0.499
9	3.0	0.4	3.070	0.465
T ₁	6.995	7.908		
T ₂	8.342	9.115		
T ₃	9.806	15.337		
R	0.937	0.402		

在细胞悬浮培养中, 2,4-D 一般有利于细胞的生长, 这与试验结果相符。但 2,4-D 添加过多会导致严重的褐变。故 2,4-D 范围选择在 0.5~3.0 mg/L。细胞分裂素选取 KT, 范围为 0.05~0.4 mg/L(见表 1)。

表 2 不同激素及浓度对皂质芦荟悬浮细胞生长影响的方差分析

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	1.595(b)	4	0.399	39.147	0.002	0.975
Intercept	70.241	1	70.241	6897.659	0.000	0.999
2,4-D	1.318	2	0.659	64.700	0.001	0.970
KT	0.277	2	0.138	13.594	0.016	0.872
Error	0.041	4	0.010			
Total	71.876	9				
Corrected Total	1.635	8				

注 Computed using alpha = 0.05; R Squared = 0.975 (Adjusted R Squared = 0.950)

进一步进行方差分析, 结果显示(见表 2), 在试验所选的水平范围内, 2,4-D 因素对试验指标达到显著($\alpha < 0.05$), KT 表现为不显著。这说明 2,4-D 在皂质芦荟细胞生长中起关键作用。以细胞鲜重为指标, 2,4-D 在取 3 水平时, KT 在取 2 水平时细胞生物量最大, 故较

适合皂质芦荟细胞悬浮生长的激素组合为 2,4-D 3.0 mg/L+KT 0.1 mg/L, 生长状态较好, 且细胞褐变轻。

2.3 细胞悬浮培养的生长曲线

从图 4 可知, 细胞鲜重与细胞干重曲线相差不大, 基本呈“S”型曲线。在延迟期(0~9 d)时, 细胞生长缓慢, 这大概是因为细胞尚未适应新的环境。随后进入对数生长期(9~15 d), 此时细胞生长加快, 增重迅速, 在 15 d 时生长量达到最大值, 细胞鲜重 3.28 g/L, 细胞干重 0.398 g/L。15 d 后生物量下降, 进入较长的生长静止期(16~27 d)。从生长曲线来看, 悬浮细胞培养与愈伤组织的生长曲线近似, 也表现出植物的生长大周期特性。通过镜检发现, 0~9 d 时细胞呈淡黄色或绿色, 较圆, 透明。培养到 15 d 时, 少量的细胞呈深褐色, 可以观察到液泡内有红褐色物质产生, 细胞团聚到一起。随培养时间的增长, 到 27 d 时大量的细胞呈现红褐色, 甚至是黑色, 细胞壁破裂。这是因为细胞中形成了大量蒽醌类物质。随着培养时间的增长, 细胞中积累的蒽醌类物质就越多, 最终对细胞本身产生毒害, 使细胞生长量不大, 并导致细胞褐化死亡。

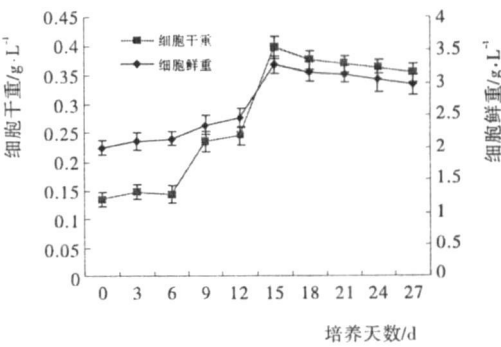


图 4 皂质芦荟细胞悬浮培养生长曲线的测定

2.4 细胞悬浮培养过程中生理生化指标的测定

2.4.1 培养液中 pH 值的变化 植物细胞(或动物、微生物)的培养基都是由一些有机、无机化学成分构成的, 这些化学成分有些是生理上酸性的, 另一些是生理上碱性的, 也有生理上中性的, 因此这些化学成分的消耗必然会反映在 pH 值的变化上; 加之培养细胞会在生长过程中分泌一些酸性或碱性物质, 可以导致 pH 值的改变。因此, 在细胞培养周期中, 培养基中 pH 值的变化是上述因素综合作用的结果。培养基的 pH 值对植物细胞的生长有重要的作用, 其表现是多方面的, 如影响植物细胞的分裂和分化; 影响植物细胞的呼吸和代谢, DNA 合成和核蛋白复合体的合成; 影响细胞膜的质膜电位和质膜透性; 影响植物激素进出细胞和胞内的作用等(曹新祥, 2003)。由图 5 可以得到, 在细胞培养过程中培养液的 pH 值发生了变化, 在前 6 d 中 pH 值下降到 4.32, 而后又开始逐渐升高, 21 d 时 pH 值达到 5.51。这与人

参(周立刚 1991)、喜树(高桂珍, 2003)的细胞悬浮过程中培养液中 pH 值变化规律相似。前期的 pH 值下降与后

期的 pH 值上升,这可能与细胞培养液中各种离子的不等量吸收以及细胞在新陈代谢中释放的物质酸碱性有关。

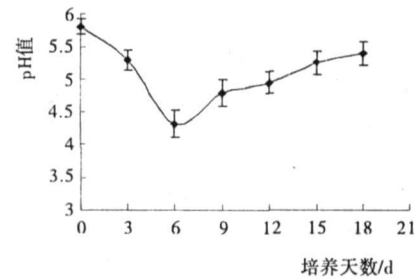


图5 细胞悬浮培养过程中培养液 pH 值的变化情况

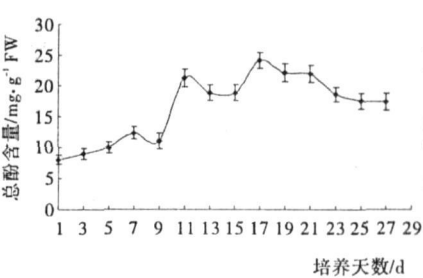


图6 总酚含量的变化趋势

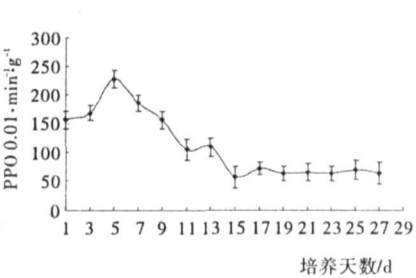


图7 多酚氧化酶 PPO 活性变化

2.4.2 不同培养时间细胞中总酚含量的变化 鞠志国研究发现,果实内的总酚含量变化与褐变有一定的关系(1988)。李焕秀等研究梨芽和茎尖多酚氧化酶活性与总酚含量也与褐变情况有一定联系(1994)。由图 6 可知,皂质芦荟细胞在悬浮培养过程中总酚含量随培养时间的延长呈逐渐增高的趋势,而且在培养后期有所下降。在培养过程中出现 2 个峰值,分别出现在 11 d 和 17 d,总酚含量为 21.26 mg/g FW、24.18 mg/g FW。随后逐渐下降,27 d 时下降到 17.46 mg/g FW。总酚含量的变化趋势与细胞生长曲线相似,与细胞褐变规律相同。都是在 11 d 和 17 d 出现 2 个峰值。因此,皂质芦荟细胞培养过程中总酚含量的变化可以作为衡量细胞褐变情况的指标之一。

2.4.3 不同培养时间内细胞中多酚氧化酶(PPO)活性的变化 多酚氧化酶是普遍存在于植物、真菌和昆虫质体中,由核基因编码,能与铜结合的金属蛋白酶。现在所说的多酚氧化酶一般是儿茶酚氧化酶和漆酶的统称。植物多酚氧化酶是酶促褐变的主要原因,同时它在植物的光合作用、抗病虫害及生长发育中起一定作用(王曼玲, 2005)。由图 7 可知,皂质芦荟细胞在悬浮培养过程中多酚氧化酶 PPO 活性随培养时间的延长先增大后减小,第 5 天时达到峰值,多酚氧化酶活性为 228(0.01/min·g)。在第 6~15 天中呈下降趋,在第 15 天达到最低值,多酚氧化酶为 58(0.01/min·g)。这是由于细胞

褐变的加剧,产生的有毒物质使细胞生命力下降,从而导致酶活力的下降。随后 16~27 d 中,多酚氧化酶活性趋于平稳。这个趋势与细胞生长规律有很大出入,同时与细胞褐变规律不呈正相关性。在开始培养的 5 d 里,皂质芦荟细胞褐化较轻,但多酚氧化酶活性达到最高,在培养后期 17~27 d 里,细胞褐变严重,逐渐死亡,而多酚氧化酶活性却很低。所以,多酚氧化酶不是皂质芦荟细胞褐变是否严重的必要条件。

2.4.4 不同培养时间内细胞中超氧化物歧化酶(SOD)比活性的变化 超氧化物歧化酶普遍存在于动植物体中。它在好氧细胞呼吸中意义重大。被认为是生物保护酶系统中的重要成员。与植物抗旱性、抗病虫性、抗盐性、脱水忍耐性和抗除草剂的能力及植物器官的老化均有一定的关系(Lee E H, 1982)。由图 8 可知,皂质芦荟细胞在悬浮培养过程中超氧化物歧化酶 SOD 比活性含量随时间的延长而增大,并出现 2 个峰值。到第 17 天达到最高峰,超氧化物歧化酶比活性为 8.29 unit/mg。这个阶段的悬浮细胞正处于细胞生长指数期间,细胞分裂速度快。此高峰的出现可能是 SOD 与细胞分裂频率有相关性。在 18~25 d 超氧化物歧化酶比活性略有下降,在 23 d 略有升高比活性 5.96 unit/mg。这可能与培养基中营养物质消耗殆尽导致的细胞老化有关。在 27 d 时,超氧化物歧化酶比活性降为 4.42 unit/mg。

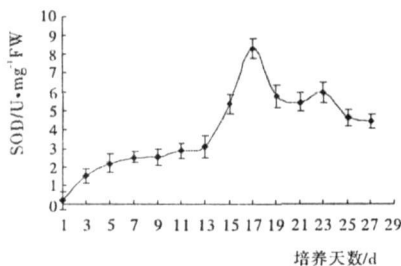


图8 超氧化物歧化酶 SOD 活性变化

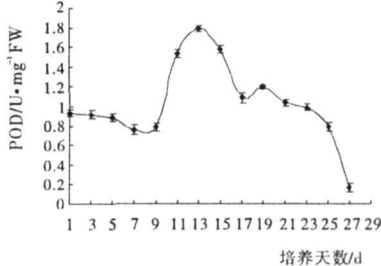


图9 过氧化物酶 POD 活性变化

2.4.5 不同培养时间内细胞中过氧化物酶活性(POD)活性的变化 过氧化物酶普遍存在于高等植物中,它不仅参与植物的呼吸代谢,而且在植物细胞的生理活动,如生长素的氧化降解;木质素与乙烯的合成;过氧化氢的形成;类黄酮的代谢均有重要作用(高贵珍, 2003)。过氧化物酶是一种与生长、分化密切相关的酶,是植物成熟与衰老的指标。

从图 9 可以看出, 刚接入愈伤组织的过氧化物酶活性为 0.934 unit/g FW, 表示此时的细胞正处于生长阶段。在培养到 9 d 时, 酶活性略有下降, 待细胞适应新环境后酶活性呈上升趋势。在培养过程中过氧化物酶有 2 个峰值, 分别出现在 13 d 和 19 d, 活性分别为 1.783 unit/g FW、1.192 unit/g FW。在培养后期 21 ~ 27 d 时过氧化物酶活性下降显著。过氧化物酶活性变化趋势与细胞生长趋势相近, 且与细胞褐变规律相近。在 27 d 时细胞褐变死亡, 而此时过氧化物酶活性降到最低。

3 小结

悬浮培养是一种使愈伤组织培养物分离成单细胞并不断扩增的液体培养技术。成功的悬浮培养技术应满足 3 个基本条件: ①悬浮培养物分散性良好, 细胞团较小, 一般由几十个以下的细胞组成; ②均一性好, 细胞形状和细胞团大小大致相同, 悬浮培养系为均一的小颗粒; ③生长速度快(朱至清, 2003)。

皂质芦荟悬浮细胞生长的最佳培养基组合为 B5+2,4-D 3.0 mg/L+KT 0.1 mg/L, pH 值为 5.8, 葡萄糖含量为 20 g/L。最佳培养条件为暗培养, 转速为 100 rpm/min, 接种量为 2.0 g/50mL。悬浮细胞的生长曲线基本符合“S”型生长规律, 0~9 d 为延迟期, 9 d 后进入对数生长期, 在 15 d 时生长量达到最大值, 细胞鲜重 3.28 g/L, 细胞干重 0.398 g/L, 15 d 后进入较长的生长静止期。

研究了培养过程中细胞生理生化指标的变化情况。培养过程中 pH 值的变化情况为先下降, 后升高, 在培养结束时, pH 值为 5.51; 培养过程中细胞内总酚含量的变化与细胞生长曲线相似, 且与细胞褐变规律相同, 均出现 2 个峰值, 因此, 可以用细胞内总酚含量来衡量细胞褐变的情况; 培养过程中多酚氧化酶 PPO 的活性变化

趋势与细胞生长规律有很大出入, 同时与细胞褐变规律不呈正相关性; 超氧化物歧化酶 SOD 的活性、过氧化物酶 POD 的活性变化规律与细胞生长曲线、细胞褐变规律有一定的相似性, 但不如细胞中总酚含量明显。因此, 说明褐变的发生不只是多酚氧化酶起作用, 而是多种因素共同作用的结果。多酚氧化酶活性的高低不是判断细胞褐变情况的充分条件。而细胞内总酚含量与褐变关系很大, 规律呈正相关性。这与罗晓芳、鞠志国、李焕秀的研究结论相同。

参考文献

- [1] 李焕秀, 王乔春, 李春秀. 梨芽和茎尖多酚氧化酶活性和总酚含量的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 1994, 2(2): 218-222.
- [2] 罗晓芳, 田砚亭, 姚洪军. 组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 92-95.
- [3] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [4] 周立刚, 郑光植. 人参细胞大量培养的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1991, 3(1): 22-28.
- [5] 刘春朝, 王玉春, 欧阳藩. 植物组织培养生产次生代谢物的研究进展[J]. 生物技术通报, 1997(5): 62.
- [6] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [7] Lee E H, Bennett L H. Superoxide dismutase A possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Plant Physiol, 1982, 69: 1444-1449.
- [8] Resonance. The Royal Society of Chemistry [M]. Vol. 16. Athenaeum Press Ltd., 1998, 116-144.
- [9] Toshihiro, Mihashi Kunihide, Yagi Akira. Five chromones from *Aloe vera* leaves [J]. Phytochemistry, 1998, 49(1): 219-223.
- [10] 鞠志国, 朱广廉. 莱阳梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 356-361.
- [11] 王曼玲, 胡中立. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 25(2): 215-222.
- [12] 高桂珍. 喜树悬浮培养细胞生理特性的初步研究[D]. 华中师范大学硕士学位论文, 2003.

Preliminary Studies on the Cell Suspension Culture of the *Aloe saponaria* Haw

ZHOU Xiao-lu, LI Si-liang

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The study focused on the suspension culture of the *Aloe saponaria* Haw. Compared the influence of different basic medium and inoculums amount on cell growth increment during the process of suspension culture. Optimized the effecting factors of the *Aloe saponaria* Haw cell in suspension culture by orthogonal design. Discussed the characters of physiological and biochemical indices in the cell growth cycle. The results indicated, B5 medium was in favor of the cell multiplication; the most suitable inoculums amount was 2 g callus per 50 mL liquid medium; the most suitable hormone combinations was 2,4-D 3.0 mg/L+KT 0.5 mg/L, glucose 25 g/L pH 5.8; the suspension culture growth cycle of the *Aloe saponaria* Haw was 25 days, the cell multiplication graph was in shape of 'S'; in the previous of suspension culture cell, the pH decreased obviously, in the logarithmic growth phase of cell, the pH slightly increased and became stable; total phenolic content, POD, SOD showed two peaks respectively, but the peaks appeared at different time, and the change trend was in direct proportion to the cell growth trend, PPO activity was in converse proportion to the cell growth trend.

Key words: *Aloe saponaria* Haw; Suspension culture; Physiological and biochemistry indices