

孔 琼,袁盛勇,肖亚楠,等. 烟草悬浮细胞系的构建[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):29-31.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.008

# 烟草悬浮细胞系的构建

孔 琼,袁盛勇,肖亚楠,杨文超,陈俊梅,蒋双番,史艳春,杨 升

(红河学院生命科学与技术学院,云南蒙自 661100)

**摘要:**烟草既是一种重要的经济作物,也可作为良好的试验材料。以 BY-2 烟草为材料,进行悬浮细胞培养体系的构建。结果表明:不同激素和浓度配比处理对烟草愈伤组织诱导具有较大影响,愈伤组织最佳诱导配方为 MS + 3.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA + 30 g/L 蔗糖 + 15 g/L 琼脂;当接种量为 3 g/150 mL、转速为 140 r/min、蔗糖浓度为 3%,且配方为 MS + 3.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA 时,悬浮细胞增殖最快,分散性最好,生长呈现“S”形规律,继代周期为 8 d。

**关键词:**烟草;愈伤组织诱导;悬浮细胞

**中图分类号:** S572.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0029-03

烟草(*Nicotian atabacum* L.)为茄科烟草属的一年生草本植物,已成为当前生物学研究最为深入的模式植物材料,尤其在植物分子生物学、基因组学等方面应用最为广泛。植物悬浮细胞因具有均一性好、条件易控制、培养周期短、重复性好等优点,已广泛应用于细胞学、发育生物学、遗传学等研究中<sup>[1]</sup>。因此,建立稳定且活性高的烟草悬浮细胞作为试验材料,是开展后期试验的重要保证之一。植物悬浮细胞的建立受很多因素的影响,其中愈伤组织的成功获得和单细胞形成是两个重要环节,同时激素种类及浓度、接种量、蔗糖浓度、转速等也是关键影响因素<sup>[2-3]</sup>。本研究以烟草的幼嫩茎髓为试验材料,进行愈伤组织诱导和继代培养,并进行悬浮细胞培养,分析不同营养条件和培养条件对细胞悬浮系培养的影响,从而建立烟草悬浮细胞系的培养方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以烟草 BY-2 品种为试验材料,烟草种子由昆明学院杨红玉教师惠赠。

### 1.2 方法

**1.2.1 愈伤组织诱导及继代培养** 将烟草幼茎切成 1 cm 长段,用 70% 乙醇消毒 30 s 后,再转入 5% 次氯酸钠中消毒 7 min,无菌水漂洗 4~5 次后用无菌滤纸吸干水分,切取茎髓,转入 9 种愈伤组织诱导培养基中,基本配方为 MS + 30 mg/L 蔗糖 + 14 mg/L 琼脂,具体激素配比见表 1。于 26 ℃ 暗培养 3 周,观察并记录愈伤组织的生长状况,统计出愈率和鲜质量。计算公式:接种量 = 接种后瓶质量(g/皿) - 接种前瓶质量(g/皿);愈伤组织鲜质量 = 收获量(g/皿) - 接

种量(g/皿);出愈率 = (诱导出愈伤组织外植体数/接种的外植体总数) × 100%。

综合比较 9 种培养基上愈伤组织的生长速度、出愈率、鲜质量、形状、分散性、颜色等指标,筛选出诱导愈伤组织生长的最佳配方,并将其配方作为愈伤组织继代和悬浮培养的配方。

### 1.2.2 悬浮细胞系的建立

**1.2.2.1 不同接种量对悬浮细胞生长的影响** 选取白色疏松的愈伤组织 1、2、3、4 g 分别接种于 150 mL 液体培养基(“1.2.1”节中的配方)中,于 26 ℃、140 r/min 摇床振荡暗培养 8 d 后测定细胞鲜质量,3 次重复。

**1.2.2.2 蔗糖浓度对悬浮细胞生长的影响** 将“1.2.2.1”节中最佳接种量培养 10 d 后的 20 mL 悬浮细胞转接到含有 10、20、30、40、50 g/L 蔗糖的 130 mL 新鲜液体培养基(“1.2.1”节中的配方)中,3 次重复,于 26 ℃、140 r/min 摇床振荡暗培养 8 d 后测定细胞鲜质量。

**1.2.2.3 转速对悬浮细胞生长的影响** 选用“1.2.2.1”节和“1.2.2.2”节筛选出的最佳接种量和蔗糖浓度,制成液体培养基,分别于 100、110、120、130、140、150 r/min 的恒温摇床上于 26 ℃ 振荡暗培养 8 d 后测定细胞鲜质量,3 次重复。

**1.2.3 悬浮细胞生长曲线、活性变化及 pH 值变化** 根据“1.2.2.1”节、“1.2.2.2”节和“1.2.2.3”节筛选出的最佳结果,将悬浮细胞于 26 ℃ 振荡培养 12 d,每隔 2 d 取样测定细胞鲜质量、pH 值和细胞活性,确定其生长周期。

### 1.2.4 数值测定

**1.2.4.1 细胞鲜质量** 根据李建安等介绍的方法<sup>[4]</sup>,具体操作:取充分混匀悬浮细胞 8 mL,注入预先称质量的 10 mL 离心管中,在 3 500 r/min 下离心 10 min,吸去上清液,室温下敞口自然风干 24 h 后称质量,减去空管质量即为 8 mL 悬浮细胞的鲜质量。

**1.2.4.2 细胞活性测定** 按照孔琼等介绍的方法<sup>[5]</sup>进行。即将 0.2 g 细胞加入 3 mL 0.6% TTC 溶液(用 50 mmol/L pH 值 7.5 磷酸缓冲液配制,内含 0.05% Tween-20),26 ℃ 暗培养 24 h,3 500 r/min 离心 10 min,细胞转入大试管中后加入 95% 乙醇 5 mL,80 ℃ 水浴 20 min,冷却后 3 500 r/min 离心

收稿日期:2016-07-22

基金项目:云南省教育厅项目(编号:2015Y451);红河学院博士启动项目(编号:14bs14);红河学院大学生科技创新基金(编号:SCI505);红河学院校级委托项目(编号:13WT001);红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介:孔 琼(1976—),女,云南宣威人,博士,副教授,主要从事植物抗病性研究。E-mail:kq\_biology2@126.com。

10 min,取上清液于 485 nm 进行比色。

2 结果与分析

2.1 烟草 BY-2 愈伤组织诱导

为了研究不同激素组合对烟草 BY-2 愈伤组织诱导的影响,分别对不同诱导培养基中愈伤组织的生长情况进行观察分析。结果显示,8 种激素配比的培养基均可诱导烟草茎髓长出愈伤组织,但愈伤组织产生的数量和性状之间存在明显差异(表 1)。其中配方 1、2 和 3 中茎髓培养第 3 天时,茎髓边缘开始膨胀变大;7 d 时,切口两端开始愈伤化,边缘产

生肉眼可见的乳白色颗粒状愈伤组织;21 d 后,出现结构疏松、生长旺盛的白色愈伤组织。但配方 3 中的愈伤组织获得量和颜色质地显著高于配方 1、2 中的诱导结果,出愈率高达 93.3%。而配方 4 未明显获得愈伤组织。配方 5 和 7 中获得的愈伤组织生长缓慢,伴有褐化现象。配方 6、8 和 9 中的愈伤组织生长缓慢,质地致密。因此,在诱导烟草 BY-2 愈伤组织过程中,激素 2,4-D 和 6-BA 配合使用比 NAA、2,4-D 和 6-BA 混合使用更能有效地促进愈伤组织产生和生长,且配方 3(MS+3.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA)为诱导烟草 BY-2 愈伤组织生长的最佳配方。

表 1 不同植物激素组合对烟草 BY-2 愈伤组织的诱导情况

组别	NAA 含量 (mg/L)	6-BA 含量 (mg/L)	2,4-D 含量 (mg/L)	出愈率 (%)	鲜质量 (g)	愈伤组织生长情况
1	0	0.3	1	83.3	3.240 2±0.028 9b	白色疏松,生长缓慢
2	0	0.5	2	83.3	2.715 4±0.541 8c	白色疏松,生长缓慢
3	0	1.0	3	93.3	4.721 0±0.052 2a	白色疏松,生长速度快
4	0.1	0.3	2	76.6	1.734 6±0.772 0d	无明显愈伤组织
5	0.1	0.5	3	80.0	1.238 1±0.058 9ef	褐化
6	0.1	1.0	1	66.7	1.034 0±0.008 6ef	黄褐色,质地致密,生长缓慢
7	0.3	0.3	3	60.0	1.020 3±0.012 9f	褐化严重
8	0.3	0.5	1	50.0	1.140 5±0.063 5ef	黄褐色,质地致密
9	0.3	1.0	2	56.7	1.146 3±0.069 1ef	褐色,致密,生长量少,速度慢

注:采用最小显著差数法(LSD)评价差异显著性,表中数值为“平均值±标准误”,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。表 2 同。

2.2 悬浮细胞系构建

2.2.1 不同接种量对悬浮细胞生长的影响 初始接种量对悬浮细胞系的生长有着明显影响,细胞需要达到一定的起始密度才能进行生长,但浓度过大又需要消耗大量的养分。因此,选择适宜的接种量是悬浮细胞培养过程中一个重要的因素。不同接种量对烟草悬浮细胞生长量具有较大影响。由图 1 可见,在 150 mL 液体培养基中,当初始接种量为 1、2 g 时,烟草悬浮细胞生长速度较慢,显著低于 3 g 和 4 g 的初始接种量;初始接种量为 3 g 时,悬浮细胞生长速度快,第 8 天后,8 mL 细胞鲜质量高达(0.727 3±0.003 8)g。

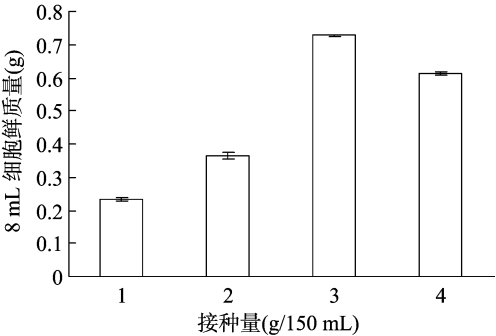


图 1 不同接种量对悬浮细胞鲜质量的影响

2.2.2 蔗糖浓度对悬浮细胞生长的影响 碳源是植物组织培养中的必需营养因子,同时也参与了渗透压的平衡调节,因此起着十分重要的作用。蔗糖浓度对烟草悬浮细胞鲜质量增加的影响如图 2 所示。当蔗糖浓度为 1%、2% 时,烟草细胞增殖不明显且差异不显著;而蔗糖浓度为 3%、4%、5% 时,细胞增殖较快,且差异显著,尤其是浓度为 3% 时,细胞增殖最快,显著高于其他处理。

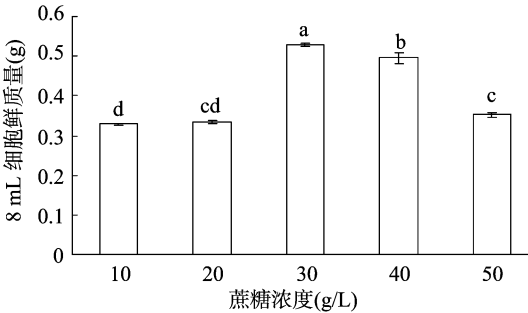


图 2 蔗糖浓度对悬浮细胞鲜质量的影响

2.2.3 转速对悬浮细胞生长的影响 不同的转速对悬浮细胞的分散性、长势和贴壁现象具有较大的影响。在最佳接种量和蔗糖浓度下,转速对悬浮细胞生长也有不同的影响,过高或过低均不利于细胞生长。当转速为 110~120 r/min 时,细胞生长缓慢,细胞鲜质量增加不明显,细胞分散性差,容易在短时间内形成较大的细胞团;转速为 130~140 r/min 时,细胞生长较快,分散性好,且 140 r/min 时细胞生长最快,培养 8 d 后 8 mL 细胞鲜质量高达(0.639 5±0.009 4)g,鲜质量高于其他处理;而当转速高达 150 r/min 时,细胞增长量有所下降,且易出现污染问题,贴壁死细胞较多(表 2)。因此适宜烟草悬浮细胞培养的转速为 140 r/min,有利于细胞生长。

2.2.4 烟草 BY-2 悬浮细胞系的生长曲线、pH 值及活性变化 在优化后的培养条件下,测定了烟草悬浮细胞培养过程中细胞鲜质量和 pH 值变化,并绘制了其生长曲线。在培养过程中,细胞生长量近“S”形规律,鲜质量变化趋势明显,且与活性变化密切相关,而培养液中 pH 值呈下降趋势(图 3 和图 4)。延迟期(1~2 d)和对数期(3~10 d)明显,且在对数

表 2 转速对悬浮细胞鲜质量的影响

转速 (r/min)	8 mL 细胞鲜质量 (g)	生长情况
110	0.336 7 ± 0.000 5d	生长速度慢,分散性差,易形成较大细胞团
120	0.351 5 ± 0.004 3cd	生长速度较慢,分散性较差,易形成细胞团
130	0.454 5 ± 0.001 5b	生长速度较快,分散性较好
140	0.639 5 ± 0.009 4a	生长速度快,分散性好
150	0.363 8 ± 0.006 0c	生长速度较慢,分散性好,易污染,但死细胞较多

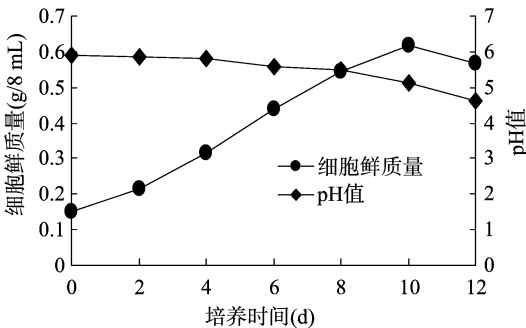


图3 烟草悬浮细胞鲜质量及 pH 值变化

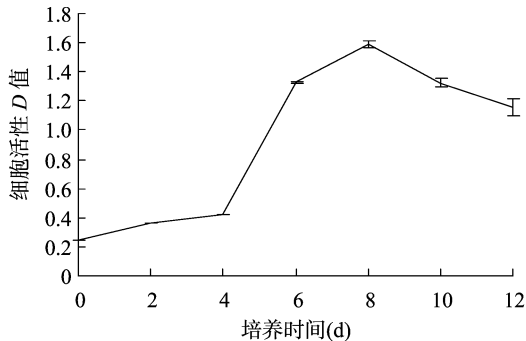


图4 烟草悬浮培养中细胞活性的变化

期时,细胞增殖明显,当培养到 10 d 时,细胞鲜质量达到最大值。根据不同培养时间下细胞活性测定结果,发现细胞活性变化与生长量变化相似,且在培养 8 d 时达到最高值,活性最好。因此结合细胞生长量变化,烟草悬浮细胞的继代周期为 8 d。

3 结论与讨论

在植物悬浮细胞培养过程中,激素是愈伤组织诱导和悬浮细胞构建的关键因素之一,不同激素种类和浓度配比后,其相互作用可影响其形态建成方向<sup>[4-6]</sup>。研究发现添加一定浓度的 2,4-D 和 6-BA 对愈伤组织诱导具有很大的促进作用,且 2,4-D 是禾谷类植物产生愈伤组织所必需的生长物质<sup>[7-8]</sup>。本研究在烟草愈伤组织诱导过程中也发现 2,4-D 和 6-BA 配比后的重要作用,且最佳诱导配比为 3.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA。因此,合适的激素种类和浓度配比是愈伤组织获取和改善状态的重要前提。

初始接种量和蔗糖的多少对悬浮细胞系建立也起着重要作用。大多数悬浮细胞的生长具有群聚效应,细胞密度过低或过高都不利于悬浮细胞系的建立,而合适的密度才能促进细胞快速生长,细胞分散性好<sup>[9]</sup>。在小麦悬浮细胞系建立过程中发现,初始接种量为 0.5 ~ 1.5 g (每 400 mL 培养液)时,

细胞增殖倍数随着接种量的增加而增加,且接种量为 1.5 g 时达到最大值,此时细胞系分散性好,颜色鲜艳,如接种量增加,细胞增殖倍数呈下降趋势,培养液颜色浑浊<sup>[10]</sup>。同样的现象也在草莓悬浮细胞系建立试验中发现<sup>[11]</sup>。蔗糖浓度过低,培养物不仅得不到碳源补充,还会发生营养物质外渗,而过高则会出现生理性缺水,两种情况最终都会导致细胞死亡<sup>[12]</sup>。大量试验结果表明,一般悬浮细胞的培养过程中蔗糖浓度一般为 20 ~ 30 g/L。因此,烟草悬浮细胞系构建的最佳初始接种量为 3 g/150 mL,蔗糖浓度为 30 g/L。

前人在研究烟草悬浮细胞系构建过程中发现,不同转速对细胞长势、分散性和贴壁现象具有较大影响<sup>[13]</sup>。同样的现象也表现于本试验中,当转速较低 (110 ~ 120 r/min) 时,悬浮培养基中的氧含量较低,细胞生长速度较慢,机械力较小,分散性较差,易结成团;而当转速较高 (150 r/min) 时,可能易发生机械损伤,死细胞较多。因此合适的转速也是悬浮细胞成功构建的关键因子。

参考文献:

[1] 吴春霞. 植物细胞悬浮培养的影响因素[J]. 安徽农业科学, 2009,37(1):36-38.

[2] 周仕顺,陶志章. 烟草的组织培养[J]. 云南农业科技,2005,24(1):28-29.

[3] 李忠光,杨仕忠,周 滔. 烟草悬浮培养细胞的建立及其对机械刺激的敏感性研究[J]. 云南师范大学学报,2005,25(6):43-45.

[4] 李建安,胡芳名. 拟南芥悬浮细胞生长特性及其继代培养条件[J]. 经济林研究,2006,4(1):26-29.

[5] 孔 琼,张 燕,张华茗,等. 拟南芥悬浮细胞系的建立[J]. 西部林业科学,2011,40(4):12-16.

[6] 谢从华,柳 俊. 植物细胞工程[M]. 北京:高等教育出版社,2004:130-131.

[7] 邢登辉,吴琴生,刘大钧. 禾谷类作物细胞培养[J]. 生物学通报,1994,29(7):1-3.

[8] 王睿辉,陈耀锋,高秀武,等. 激素对小麦幼胚胚性无性系高频率诱导的影响[J]. 西北农林科技大学学报,2001,29(1):33-36.

[9] 张 瑜,杨知建,张志扬,等. 不同浓度激素对野生细叶结缕草愈伤组织的诱导与分化的影响[J]. 生物技术通报,2007(2):143-146.

[10] 陈 琰. 不同抗叶锈小麦品种悬浮细胞系的建立[D]. 保定:河北农业大学,2005:16.

[11] 周春江,李卫东,葛海波. 草莓悬浮细胞系的建立及某些影响因素[J]. 植物生理学报,2002,38(1):22-24.

[12] 邹洪波. 拟南芥悬浮细胞系建立及硒对拟南芥生长的影响[D]. 长沙:湖南大学,2007:18-19.

[13] 王 荣. 疫霉菌激发子 parasiticein 诱导烟草细胞凋亡及发生机制研究[D]. 泰安:山东农业大学,2007:30-31.