

文章编号: 1674-7054(2013)04-0381-05

植物悬浮细胞培养的关键技术及存在问题

戴雪梅, 华玉伟, 李哲, 黄天带, 孙爱花, 周权男, 黄华孙

(中国热带农业科学院 橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/
国家橡胶树育种中心, 海南 儋州 571737)

摘要: 介绍了建立良好植物悬浮细胞系的几个关键技术(外植体的选择、胚性愈伤组织的甄别及合适的培养条件), 同时阐明了悬浮细胞系建立过程中存在的一些问题及相应的解决措施。

关键词: 悬浮细胞培养; 外植体; 胚性愈伤组织; 培养条件

中图分类号: Q 813.1

文献标志码: A

植物悬浮细胞培养是将植物活体组织或离体组织培养物如愈伤组织、多芽体等转至合适的液体培养基中, 置于特定转速的摇床上进行振荡悬浮培养, 经过周期的继代培养和筛选后形成稳定均一的悬浮细胞系。一个好的悬浮细胞系通常具备以下3个特征^[1-2]: 1) 悬浮培养物易分散, 细胞团相对较小, 一般由数十个以内的细胞聚合而成; 2) 细胞大小均一, 形态一致, 细胞颜色呈鲜艳的乳白色或淡黄色, 培养基清澈透亮; 3) 细胞快速生长, 生长周期呈典型的“S”型。植物悬浮细胞具备的这些特征使其不仅是易于诱导细胞胚大量同步发生的理想材料, 也是许多作物进行原生质体培养和体细胞杂交的重要材料, 此外, 还可用来制造人工种子, 筛选突变体以及生产次生代谢物质等^[3-5]。可见, 植物悬浮细胞培养体系的建立是非常有应用前景和实用价值的生物工程手段之一。

1 植物细胞悬浮培养的发展

植物细胞悬浮培养最先是在草本植物上获得成功的, 研究较多的是作为植物组织培养模式植物之一的胡萝卜。早在1958年, 美国的 STEWARD 等^[6]以胡萝卜块根的韧皮部组织为外植体进行液体培养, 建立了胡萝卜细胞悬浮系, 并经体细胞胚发生途径再生完整植株。周玲艳和秦华明^[7]则以胡萝卜块根去除韧皮部和木质部的切片为外植体诱导出了4种类型的愈伤组织, 并指出只有浅黄色疏松易分散的I型愈伤组织可直接快速建立良好的悬浮细胞系。林阅兵^[8]以胡萝卜整个肉质根小切段为外植体诱导出愈伤组织, 进而建立了胚性细胞悬浮系, 并以悬浮细胞为材料进行原生质体分离培养和属间细胞融合的研究。其他重要的草本模式植物如烟草^[9]、拟南芥^[10]等悬浮细胞培养体系的建立也相继获得成功和应用。

虽然双子叶植物的细胞培养取得了很大的进展, 但是对于单子叶植物, 尤其是具有重要农业价值的禾谷类植物, 经由离体组织培养获得再生植株相对比较困难。直到1980年 VASIL 等^[11]报道以珍珠粟未成熟合子胚为起始材料建立了胚性悬浮细胞系, 并将其用于原生质体的分离和培养, 成功获得了第1例禾谷类原生质体再生植株。在此基础上, 研究者们先后报道了水稻^[12]、谷子^[13]、玉米^[14]、大麦^[15]、小麦^[16]和香蕉^[17]等单子叶农作物胚性细胞悬浮培养体系的建立和植株再生, 并以胚性悬浮细胞为材料进行了遗传转化操作^[18-19], 或作为原生质体的分离材料进行原生质体培养和体细胞杂交等研究^[20-22], 从

收稿日期: 2013-10-12

基金项目: 海南省自然科学基金(311089); 农业部作物种质资源保护项目(NB2013-2130135); 科研院所基本科研业务费专项资金(1630022013002)

作者简介: 戴雪梅(1981-), 女, 广东梅州人, 中国热带农业科学院橡胶研究所助理研究员, 博士。

通信作者: 黄华孙, 男, 研究员, E-mail: xjshhs@163.com

而为此类农作物进行遗传改良和体细胞杂交等生物工程的应用开辟了新的可行途径。

木本植物,尤其是高大乔木的细胞悬浮培养及植株再生也存在较大的难度。在我国,直到 20 世纪 90 年代才有相关研究的报道。王影等^[23]以小叶杨水培苗的嫩茎为外植体,诱导出愈伤组织细胞无性系,并建立了胚性悬浮细胞系,最终经体胚发生途径获得了完整的植株。赖钟雄和陈振光^[24]采用来源于龙眼幼胚的胚性愈伤组织为材料,建立了龙眼的胚性悬浮细胞系,并研究了细胞悬浮培养的影响因素及继代保持的方法,最后同样经体胚发生途径获得了再生植株。杨远媛等^[25]则采用游离核时期的油松胚珠为外植体诱导出愈伤组织并建立了生长快速、均一稳定的悬浮细胞系。此外,在许多其他乔木中也相继建立了胚性细胞悬浮培养及其植株再生体系,如荔枝^[26]、棉花^[27]、橡胶树^[28]等。为木本植物通过生物技术育种方式进行品种改良和创造新的种质提供了良好的受体系统。

2 植物悬浮细胞培养的关键技术

2.1 外植体的选择 外植体的年龄及其生理状态在诱导胚性愈伤组织中往往起着决定性的作用。选择合适的外植体以及适当的外植体发育时期,是诱导和长期保持植物胚性愈伤组织的关键所在^[29]。通常能最有效诱导胚性愈伤组织形成的是处于某一特定发育阶段的未成熟的分生组织,而不同的植物,外植体的选择差异较大。一般来说,禾本科植物所用的外植体大多为种子、幼胚、幼穗等,草本植物大多使用根、茎尖、嫩叶、叶柄等,木本植物使用较多的是嫩茎、下胚轴、未成熟花药、内珠被等。只有选择合适的外植体,才能获得良好的胚性愈伤组织,才能更快速地建立高效的植物细胞悬浮培养体系^[4]。

2.2 胚性愈伤组织的甄别 一般植物外植体经诱导后通常可产生 3 种类型的愈伤组织:1) 质地柔软、含水量高、不规则或棉絮状的白色愈伤组织,这种类型的愈伤组织为典型的非胚性愈伤组织,在继代培养过程中极易褐化死亡^[30],或经长期继代后仍不发生明显变化^[31],不适用于悬浮培养;2) 质地坚硬、块状、颜色鲜黄的愈伤组织,经过较长时期的继代培养后,可转变为易碎、透明的胚性愈伤组织^[32],这类愈伤组织在进行悬浮培养后往往需经较长时间的继代筛选才有可能建立均一稳定的细胞系;3) 质地疏松易碎、小颗粒状、颜色呈白色或黄色的愈伤组织,在继代培养过程中表现为分裂能力强,增殖速度快,且具有较强的胚胎发生能力,这种类型的愈伤组织为典型的胚性愈伤组织,最适合用于启动悬浮培养并且能快速建立稳定悬浮细胞系的愈伤组织^[33]。

胚性和非胚性愈伤组织除了存在上述外形上的差异外,在细胞形态上也表现出明显的不同。一般来说,非胚性愈伤组织的细胞特征为细胞较大、外形不规则、高度液泡化、细胞结构松散、胞间隙大、细胞核小或不明显^[34];而胚性愈伤组织则表现为细胞较小、近圆形,具有较高的核质比,液泡小,细胞质浓厚,且单个的胚性细胞团常常围以加厚的外壁,将其与非胚性组织明显分开^[35]。这种细胞形态上的差异为甄别和挑选出良好的胚性愈伤组织进行悬浮培养提供了相对可靠的细胞学依据。

2.3 合适的培养条件 在获得良好的胚性愈伤组织进行细胞悬浮培养时,培养基的基本成分及外源激素是影响悬浮细胞系建立成败的关键性因素。通常大多使用 MS 作为基本培养基,并附加特定的植物外源激素^[23-27],主要是生长素类(如萘乙酸、2,4-二氯苯氧乙酸等)和细胞分裂素类(如 6-苄氨基嘌呤、激动素等),也有采用 N6 和 B5 基本培养基并附加合适的外源激素的^[12,36]。基本培养基的作用主要是为细胞生长提供必需的大量元素、微量元素及碳源,在没有特殊需求的情况下,同一物种可通用多种基本培养基,如烟草、水稻和拟南芥等。生长素类植物激素主要起促进细胞扩大和增殖的作用,细胞分裂素类则在促进细胞发生有丝分裂,诱导细胞分化等方面起重要作用,两者必须通过实验摸索和优化后确定合适的浓度和恰当的比例配合使用,才能更好地促进悬浮细胞的分散和快速生长^[2]。

选定合适的培养基后,愈伤组织的起始接种密度对悬浮细胞的生长也有较大的影响。化青报等^[3]指出,在进行植物细胞悬浮培养时,起始接种密度必须达到一定的有效密度才能维持细胞的正常分裂和生长。如果接种密度过低,悬浮细胞表现为生长滞后缓慢,甚至极易褐化死亡。接种密度过高,培养基中的养分被迅速消耗,细胞生长发育受限且更快进入老化阶段,需更频繁的继代操作以进行培养基的更换,造成人力和物资的浪费。只有采取合适的接种密度,才能既充分利用培养基中的营养物质,又使细胞的分裂和生长达到相对理想的状态。

适宜的继代培养周期对维持悬浮细胞的正常生长亦起着重要作用。诸葛强和阙国宁^[38]对杉木悬浮细胞系的研究结果表明,杉木悬浮细胞系的继代周期不能超过10 d,否则会导致细胞褐化甚至死亡。周春江等^[39]在对草莓悬浮细胞系的建立研究中指出,太短的继代周期会造成细胞生长速度减慢,而继代周期过长,悬浮细胞由于培养基中的养分消耗殆尽,而进入饥饿状态,表现为细胞内含物变少、液泡变大。此外,继代更新液体培养基时保留一定比例的旧培养液能使细胞更快恢复生长,这是因为悬浮培养的细胞在生长过程中能分泌某些有促进细胞分裂作用的特殊物质,使得旧培养液中通常含有这些物质^[40]。但由于旧培养液营养成分已消耗殆尽,甚至往往含有一些有害物质,因此,在更换培养基时,旧培养液所占的比例必须适度,最多不能超过总体积的一半。黄纯农等^[41]在大麦胚性悬浮细胞系建立的研究中表明,当旧培养液所占比例小于总体积的十分之一时,细胞容易褐化,难于恢复生长;而保留太多的旧培养液时,细胞易呈饥饿状态而变得不致密,影响其后的生长和分化能力。

3 植物悬浮细胞培养存在的主要问题

褐化是植物细胞悬浮培养过程中普遍存在的主要问题之一,采取有效措施控制褐化是成功建立植物悬浮细胞系的关键^[42]。陈正华^[43]指出影响植物组织培养物褐变的因素有外植体基因型和生理状态、培养基及其附加成分、培养条件(温度、光照)等,目前对其尚无确切有效的防治措施。虽然在实验中无法完全消除褐化现象,但是采取适当的方法,可使其在一定程度上得到抑制,并有可能将其带来的不良影响降至最低^[44]。目前防止褐变最常规的手段是在培养基中添加抗褐化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸、脱落酸、柠檬酸、活性炭、硫代硫酸钠、硝酸银、水解酪蛋白等。不同的植物和外植体往往适用不同的抗褐化剂。黄浩等^[45]认为,适宜作红豆杉悬浮细胞的抗褐变剂有活性炭、水解酪蛋白和植酸,而使用维生素C、半胱氨酸和脱落酸等效果不佳。

随着继代培养时间的延长,植物悬浮细胞会产生一定的遗传变异,以及胚胎发生能力逐渐下降甚至完全丧失等问题^[46-47],这是目前植物,尤其是单子叶植物细胞悬浮培养中存在的主要问题,也是建立并维持悬浮细胞来源的原生质体培养植株再生体系的瓶颈所在。例如,在笔者实验室对橡胶树的原生质体分离和培养过程中,只有用3~18个月龄的胚性细胞系才能得到具有再生能力的原生质体,1.5年龄以上的悬浮细胞系分离的原生质体要么再生频率很低,要么只能诱导出畸形的体细胞胚,很难进一步发育成完整植株。类似的现象在水稻、玉米、小麦和香蕉等作物中也普遍存在。目前,研究者常用的防止悬浮细胞系在继代过程发生遗传变异和保持悬浮细胞系胚胎发生能力的方法主要有2种:1)最简单直观的方法是快速建立悬浮细胞系并使用新近建立的悬浮细胞系进行相关的研究。MIKSCHOFISKY等^[48]报道了在使用胡萝卜悬浮细胞系进行转基因生物制药时,长期继代的悬浮细胞其产量明显下降,而使用新近建立的悬浮细胞系能获得持续高效的生物药产量。2)进行悬浮细胞系的超低温保存^[47]。WANG等^[49]报道了采用玻璃化法对葡萄的胚性悬浮细胞系进行超低温保存的研究,结果表明,经冻存和解冻后的细胞在继代培养2次后即可恢复生长,且其生长速度和胚性能力与未冻存的细胞无明显差异。KOBAYASHI等^[50]则采用逐步冷冻法对烟草的悬浮细胞进行超低温保存,细胞在经解冻后培养7 d即可恢复生长,而且冻存细胞的形态和生长状态与对照细胞没有任何差异。

4 结 论

植物悬浮细胞系建立的关键技术主要有以下几点:外植体的选择、胚性愈伤组织的甄别及合适的培养条件(包括培养基成分、起始悬浮培养的细胞密度和继代培养周期等)。植物悬浮细胞在培养过程中普遍存在褐化、遗传变异及胚性下降甚至丧失等问题,采取适当的措施能使这些问题得到一定的控制。但是要想从根本上杜绝这些问题的发生,还得从其产生的分子机理及生理生化上进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 36-48.
- [2] 路铁刚, 叶和春. 细胞悬浮培养植物细胞工程试验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 36-47.
- [3] 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.

- [4] 方文娟, 韩烈保, 曾会明. 植物细胞悬浮培养影响因子的研究[J]. 生物技术通报, 2005(5): 11–15.
- [5] 杨帆, 赵君, 张之为, 等. 植物悬浮细胞的研究进展[J]. 生命科学研究, 2010, 14(3): 257–262.
- [6] STEWARD F C, MAPES M O, SMITH J. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells [J]. American Journal of Botany, 1958, 45(9): 693–703.
- [7] 周玲艳, 秦华明, 胡萝卜悬浮细胞系及高效再生系统的建立[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(16): 3929–3931.
- [8] 林阅兵. 人参和胡萝卜原生质体培养再生植株的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [9] 刘金娜, 张秀清, 马秋敏, 等. 转番茄 *Bax inhibitor-1* 基因烟草悬浮细胞系的建立[J]. 北方园艺, 2010(24): 149–151.
- [10] 孔琼, 张燕, 张华茗, 等. 拟南芥悬浮细胞系的构建研究[J]. 西部林业科学, 2011, 40(4): 12–16.
- [11] VASIL V, VASIL I K. Isolation and culture of cereal protoplasts [J]. Theor Appl Genet, 1980, 56(3): 97–99.
- [12] 袁力勇, 李绍清, 李阳生, 等. 水稻悬浮细胞系的建立 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(4): 373–376.
- [13] 杨丽军, 许智宏. 悬浮培养的谷子细胞的胚胎发生和植株再生[J]. 实验生物学报, 1985, 18(4): 493–498.
- [14] VASIL V, VASIL I K. Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1987, 73(6): 793–798.
- [15] LÜHR S, LÖRZ H. Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1987, 75: 16–25.
- [16] VASIL V, REDWAY F, VASIL I K. Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Nature Biotechnology, 1990(8): 429–434.
- [17] DAI X M, XIAO W, HUANG X, et al. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts of dessert banana cv. ‘Da Jiao’ (*Musa paradisiaca* ABB Linn.) via somatic embryogenesis [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2010, 46(5): 403–410.
- [18] WAGIRAN A, ISMAIL I, ZAIN C R, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the isopentenyltransferase gene in japonica rice suspension cell culture [J]. Aust J Crop Sci, 2010, 4(6): 421–429.
- [19] GHOSH A, GANAPATHI TR, NATH P, et al. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. *Robusta* (AAA) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2009, 97(2): 131–139.
- [20] XIANG F N, XIA G M, CHEN H M. Asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and *Avena sativa* L [J]. Science in China Ser. C, 2003, 46(3): 243–252.
- [21] YAN C Q, QIAN K X, YAN Q S, et al. Use of asymmetric somatic hybridization for transfer of the bacterial blight resistance trait from *Oryza meyeriana* L. to *O. sativa* L. ssp. *japonica* [J]. Plant Cell Reports, 2004, 22: 569–575.
- [22] XIAO W, HUANG X, GONG Q, et al. Somatic hybrids obtained by asymmetric protoplast fusion between *Musa Silk* cv. Guoshanxiang (AAB) and *Musa acuminata* cv. Mas (AA) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2009, 97: 313–321.
- [23] 王影, 黄敏仁. 杨树细胞悬浮培养及体细胞胚胎发生的研究[J]. 南京林业大学学报, 1991, 15(3): 31–36.
- [24] 赖钟雄, 陈振光. 龙眼胚性细胞悬浮培养再生植株[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 485–491.
- [25] 杨远媛, 贺宽青, 郑彩霞. 油松胚珠愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 591–594.
- [26] 赖钟雄, 黄浅, 林秀莲. 荔枝胚性悬浮细胞系的快速建立及其体胚植株再生[J]. 农业生物技术科学, 2007, 23(1): 28–32.
- [27] 夏启中, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花胚性细胞悬浮系的建立及其影响因素分析[J]. 棉花学报, 2005, 17(1): 12–17.
- [28] 倪燕妹. 橡胶树易碎胚性愈伤组织诱导、长期继代培养及植株再生研究[D]. 儋州: 海南大学, 2010.
- [29] 邵宏波, 初立业. 禾本科植物细胞悬浮培养和影响胚胎发生的几个因素[J]. 生物技术通报, 1990(3): 1–5.
- [30] 李春瑶. 甘蔗幼叶愈伤组织发生的形态学和组织学研究[J]. 广西师范大学学报, 1994(12): 65–69.
- [31] MATSUDA Y, ADACHI T. Plant regeneration via embryogenesis in commercial cultivars of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl.) [J]. Plant Science, 1996, 119: 149–155.
- [32] CONCEICAO A D S, MATSUMOTO K, BAKRY F, et al. Plant regeneration from long-term callus culture of AAA-group dessert banana [J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1998, 33: 1291–1296.
- [33] 陈婷, 栾恒淳, 李力, 等. 水稻悬浮体细胞胚胎发生及其特异蛋白[J]. 东北师大学报, 2000, 32(4): 52–58.
- [34] 邢登辉, 吴琴生, 刘大钧. 黑麦胚性愈伤组织和体细胞胚胎形成过程中内源 IAA 和 ZT 变化的初步研究[J]. 生物工程学报, 1996(12): 295–296.
- [35] VASIL V, VASIL I K. Characterisation of an embryogenic cell suspension derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* [J]. American Journal of Botany, 1982, 69: 1441–1449.

- [36] 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, 24(1): 26–29.
- [37] 化青报, 翟晓巧, 段艳芳. 木本植物悬浮细胞培养影响因素研究[J]. 河南林业科技, 2008, 28(2): 13–15.
- [38] 诸葛强, 阙国宁. 杉木悬浮细胞系的建立和原生质体的分离[J]. 林业科学研究, 1992, 5(6): 628–632.
- [39] 周春江, 李卫东, 葛会波. 草莓悬浮细胞系的建立及某些影响因素[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(1): 22–24.
- [40] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 25–26.
- [41] 黄纯农, 王君晖, 颜秋生, 等. 大麦胚性悬浮细胞系的快速建立及其超低温保存[J]. 中国农业科学, 1995, 28(3): 21–27.
- [42] DEBERGH P C, ZIMMERMAN R H. Micropropagation: technology and application[M]. Holland: Kluwer Academic Publisher, 1991: 1–13.
- [43] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [44] 徐振彪, 傅作申, 原亚萍, 等. 组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学—杂粮作物, 1997(1): 55–56.
- [45] 黄浩, 鲁明波, 梅兴国. 红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J]. 华中理工大学学报, 1999, 27(4): 107–109.
- [46] 许智宏. 植物体细胞遗传变异[J]. 遗传, 1985, 7(6): 37–40.
- [47] STROSSE H, DOMERGUE R, PANIS B, et al. Banana and plantain embryogenic cell suspensions (Vezina A and Picq C, eds). INIBAP Technical Guidelines 8 [M]. Montpellier, France: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, 2003: 21–25.
- [48] MIKSCHOFKY H, HAMMER M, SCHMIDTKE J, et al. Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2009, 45(6): 740–749.
- [49] WANG Q C, MAWASSI M, SAHAR N, et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2004, 77: 267–275.
- [50] KOBAYASHI T, NIINO T, KOBAYASHI M. Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell cultures [J]. Plant biot, 2005, 22(2): 105–112.

Key Technologies and Their Problems in Plant Cell Suspension Culture

DAI Xuemei, HUA Yuwei, LI Zhe, HUANG Tiandai, SUN Aihua,
ZHOU Quannan, HUANG Huasun

(Rubber Research Institute, CATAS/ Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree,
Ministry of Agriculture/State Center for Rubber Tree Breeding, Danzhou 571737, China)

Abstract: Several key technologies for establishing an efficient plant cell suspension are described, including selection of explants, identification of embryogenic callus and proper culture condition. Some problems and their solutions in plant cell suspension culture are also demonstrated to provide reference for the related research work.

Key words: cell suspension culture, explant, embryogenic callus, culture condition.