

葡萄悬浮细胞系的建立

杜晓映, 张振文, 夏 惠, 徐国前

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】建立适合葡萄悬浮细胞系快速稳定生长的培养体系。【方法】以鲜食葡萄巨峰的果皮为材料,以 B5 为基本培养基,通过选择合适的激素配比及浓度、pH、蔗糖浓度等建立并优化葡萄愈伤组织培养体系及细胞悬浮培养体系。【结果】在 B5+0.5 mg/L 6-BA+NAA 条件下,NAA 最适质量浓度为 1 mg/L;在 B5+0.5 mg/L 6-BA+2,4-D 条件下,2,4-D 最适质量浓度为 1.0~2.0 mg/L;在 B5+1 mg/L NAA+6-BA 条件下,6-BA 最适质量浓度为 0.5~1.0 mg/L;在 B5+2 mg/L 2,4-D+KT 条件下,KT 的最适质量浓度 0.2 mg/L。在最佳蔗糖质量浓度 30 g/L、最适 pH 5.5~5.8 培养基条件下,建立了能快速生长的均一、稳定的巨峰葡萄细胞悬浮体系,优化了培养条件。【结论】适合葡萄愈伤组织生长的培养体系为:B5+250 mg/L 水解酪蛋白+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂;适合葡萄细胞悬浮培养的体系为:B5+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖和 B5+250 mg/L 水解酪蛋白+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖。

【关键词】 巨峰葡萄;愈伤组织;悬浮细胞;培养体系

【中国分类号】 Q813.1;S663.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)01-0199-06

Establishment of suspension cell system of grape Kyoho

DU Xiao-ying,ZHANG Zhen-wen,XIA Hui,XU Guo-qian

(College of Enology,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The research established a suitable method for the stable and rapid growth of grape suspension culture. 【Method】 With the fruits of Grape Kyoho (*V. vinifera* L.) as materials,B5 medium as basic medium, at the condition of proper hormone concentration and ratio,pH and sucrose to induce callus,a suspension culture system was established and optimized. 【Result】 The hormone concentration was determined in such a way:NAA 1 mg/L,at the condition of B5+0.5 mg/L 6-BA+NAA;2,4-D 1.0-2.0 mg/L,at the condition of B5+0.5 mg/L 6-BA +2,4-D;6-BA 0.5-1.0 mg/L,at the condition of B5+1 mg/L NAA +6-BA;KT 0.2 mg/L,at the condition of B5+2 mg/L 2,4-D+KT. Their effects compared the proper hormone ratio was decided,and the rapid growth,equal,and stabilized grape suspension culture was established at the condition of pH 5.8 and sucrose 30 g/L. 【Conclusion】 The instance of callus induction and suspension celll system establishment of Grape Kyoho indicate: the suitable medium for inducing callus is B5+250 mg/L hydrolyzed casein+0.1 mg/L NAA +0.2 mg/L KT+30 g/L sucrose+6 g/L agar,while suitable liquid medium for suspension culture for Kyoho is B5+0.5 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+30 g/L sucrose and B5+250 mg/L hydrolyzed casein +0.1 mg/L NAA +0.2 mg/L KT+30 g/L sucrose.

Key words: grape Kyoho;callus;suspension cell;culture system

* [收稿日期] 2008-01-22
[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项计划“葡萄与葡萄酒产业关键技术研究”(2007ZDKG-09)
[作者简介] 杜晓映(1981—),女,山东安丘人,在读硕士,主要从事酿酒葡萄原料资源研究。E-mail:duxyl08@163.com
[通信作者] 张振文(1960—),男,陕西耀县人,教授,博士生导师,主要从事葡萄与葡萄酒研究。
E-mail:Zhangzhw60@nwsuaf.edu.cn

葡萄(*Vitis* L.)是一种经济价值很高的作物,除可以鲜食、制干和酿酒外,其自身许多次生代谢产物,如白藜芦醇和花青素等对人体的健康非常有益。这类葡萄自身代谢产物在结构上属于多酚类化合物,具有抗氧化、预防心脑血管疾病、预防癌症和美容护肤之功效^[1-2]。随着市场需求量的日益增加,直接从植物中提取次生代谢产物已经难以满足需求。细胞悬浮培养具有繁殖速度快、可大规模培养、能提供大量均匀一致的植物细胞培养物等优点^[3-4],不仅可以控制在可控制和可重复条件下高效地生产多酚等天然产物^[5-7],还可以更方便地检测植物生长过程中生理生化指标的变化以及蛋白质和酶的活性变化,从而可以利用合适的调控因子来调节目标代谢物的形成^[8]。目前此方面的研究较多,Larronde 等^[9]建立了一种细胞悬浮培养模式研究蔗糖对酿酒葡萄悬浮细胞多酚合成的调节机制;Xavier 等^[10]对蔗糖和硝态 Ca^{2+} 调节葡萄悬浮细胞产生花青素的机理进行了研究;Alain 等^[11]利用葡萄细胞悬浮培养来生产酰基儿茶酚和白藜芦醇二糖苷;Cassandrine 等^[12]应用¹³C NMR 和 HPLC 分析了添加不同物质对白藜芦醇和花青素产生途径和最终含量的影响;Zhang 等^[13]研究了茉莉酸甲酯和光照对葡萄细胞产生花青素的影响;国内曲均革等^[14]研究了苯丙氨酸前体饲喂和环糊精等 5 种诱导子联合作用对葡萄细胞悬浮培养产生花青素的影响。

现有的研究提示,实现悬浮培养生产次生代谢产物通常需要 2 个步骤,一是扩增生物量,二是促进次生代谢物的合成^[15]。目前,虽然利用悬浮培养来生产次生代谢物已广泛应用于各科植物中,如紫草、人参、黄连等已经达到了商品化水平,长春花、毛地黄、烟草等已实现工业化生产^[5],但对于葡萄的悬浮培养生产次生物质的报道很少,国内这方面的研究更少,相关报道大部分只停留在对其机理的研究阶段,涉及的葡萄品种也很少。影响葡萄悬浮培养研究进程的主要原因在于葡萄细胞对悬浮培养条件要求比较苛刻,由于多酚含量高,在悬浮培养过程中容易褐化。因此,找出适合葡萄细胞扩增培养的条件,快速稳定地建立起葡萄细胞悬浮体系,是实现其次生代谢产物大规模培养生产的基础。本研究以巨峰葡萄(*V. vinifera* L.)果皮为研究对象,以 B5 作为基本培养基,对葡萄愈伤组织诱导及培养条件进行了研究,建立起适合葡萄细胞扩增培养的悬浮培养体系,以期利用葡萄悬浮培养体系生产多酚等次生代谢物提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材 料

- 1.1.1 葡 萄 市售鲜食巨峰葡萄。
- 1.1.2 试 剂 B5 培养基母液、NAA、6-BA、2,4-D、KT(北京康倍斯)、蔗糖和琼脂等。

1.2 葡萄愈伤组织的诱导

参照王雅梅^[16]和高金辉等^[17]的方法进行愈伤组织的诱导。

1.3 葡萄细胞的悬浮培养及继代培养

选取连续继代数次(3 次以上)的新鲜、松软易碎的黄白色葡萄愈伤组织 10~15 g,置入装有 40 mL 液体培养基的 100 mL 三角瓶中,于 25 ℃、黑暗条件下、120 r/min 摇床上振荡培养。24 h 后,将葡萄细胞悬浮液静置片刻,弃去大的组织团块及细胞团,将上层培养基连同单细胞和小细胞团一起转移到灭菌空三角瓶中继续振荡培养。3~4 d 后,视情况用同样的方法再转移 1 次。1 周后向已经粘稠的、处于对数生长期的细胞加入其 1/2 体积的液体培养基稀释,继续振荡培养。达到一定体积后转移到较大的三角瓶中,继续添加培养基振荡培养,直至得到一定数量的均一稳定的细胞悬浮培养物。

1.4 葡萄愈伤组织诱导培养基的筛选

根据文献[13-14]和预试验,以 3 种不同激素质量浓度和配比的培养基作为诱导葡萄愈伤组织的固体培养基进行诱导培养,14 d 后统计诱导率(诱导出愈伤组织的瓶数/总接种瓶数),根据诱导率的大小确定固体培养基。3 种诱导愈伤组织的固体培养基为:

- I : B5+0.5 mg/L 6-BA+6 mg/L NAA+30 g/蔗糖+6 g/L 琼脂;
- II : B5+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂;
- III : B5+250 mg/L 水解酪蛋白+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂。

1.5 葡萄细胞悬浮培养基的选择

1.5.1 悬浮培养激素质量浓度的筛选 本试验葡萄愈伤组织初始接种量均为 200 g/L。在培养基 pH 为 5.8,蔗糖质量浓度为 30 g/L 的条件下,向其中添加不同质量浓度的 NAA、2,4-D、6-BA 和 KT,组成不同激素配比的培养基培养葡萄细胞,14 d 后测定悬浮细胞生长量,计算细胞增殖倍数,确定悬浮培养所需要的激素组合及质量浓度。各组处理均重复 3 次,其激素配比如下:

- (1)NAA。培养基组成 B5+0.5 mg/L 6-BA+NAA,其中 NAA 设 1,2,3,4,5,6 mg/L 6 个质量浓

度梯度。比较不同 NAA 浓度的培养效果并确定其最适质量浓度。

(2)2,4-D。培养基组成为 B5+0.5 mg/L 6-BA +2,4-D,其中 2,4-D 设 0.5,1.0,1.5 mg/L 3 个质量浓度梯度。比较不同 2,4-D 浓度的培养效果并确定其最适质量浓度。

(3)6-BA。培养基组成为 B5+1 mg/L NAA+6-BA,其中 6-BA 设为 0.1,0.5,1.0 和 2.0 mg/L 4 个质量浓度梯度。比较不同 6-BA 浓度的培养效果并确定其最适浓度。

(4)KT。培养基组成为 B5+2 mg/L 2,4-D +KT,其中 KT 设为 0.1,0.2,0.3 和 0.4 mg/L 4 个质量浓度梯度。比较不同 KT 浓度的培养效果并确定其最适质量浓度。

1.5.2 培养基激素配比的选择 由于上述处理所进行的时间不同,接种时愈伤组织的状态也有差异,因此根据试验结果选取各组中的最佳组合,在相同的培养条件下对葡萄细胞进行培养,比较其培养效果,筛选能够快速建立起葡萄细胞悬浮生长体系的培养基组合。

1.6 葡萄愈伤组织和悬浮培养基蔗糖质量浓度和 pH 的选择

将蔗糖质量浓度设为 10,20,30,40 和 50 g/L 5 个梯度,pH 设为 5.0~5.4,5.5~6.0,6.1~6.5 共 3 个范围,组成不同蔗糖浓度、PH 的培养基对葡萄愈伤组织和悬浮细胞进行培养。10 d 后对愈伤组织和悬浮细胞的生长状况进行观察,根据生长状况筛选合适的蔗糖质量浓度和 pH。

1.7 葡萄细胞悬浮培养接种量的选择

接种量分为初始接种量和继代接种量。取 6 个装有 40 mL 液体培养基的 100 mL 三角瓶,分别接入 2,4,10,16,20 和 25 g 愈伤组织(愈伤组织起始质量浓度分别为 47.6,90.9,200.0,285.7,333.3 和 384.6 g/L),每天测定细胞的生长量,确定适宜的初始接种量。继代培养时,向 40 mL 培养基分别接 2,

2.5,5 和 10 g 悬浮细胞(悬浮细胞起始质量浓度分别为 47.6,58.8,111.0 和 200.0 g/L),各组处理重复 3 次,每隔 2 d 测定细胞的生长量,确定最适继代接种量。

1.8 葡萄悬浮细胞生长量的测定

取正在生长的葡萄细胞悬浮液 5 mL,将细胞悬浮液真空抽滤,用蒸馏水冲洗 3 次,抽滤后称其鲜质量(Fresh cell weight,FCW),然后在 60 ℃烘箱中过夜烘干至恒重,称其干质量(Dry cell weight,DCW),计算悬浮细胞生长量。

2 结果与分析

2.1 葡萄愈伤组织诱导培养基的选择

以 B5 作为基本培养基,比较 3 种培养基的诱导效果。由表 1 可见,Ⅲ号培养基适合巨峰葡萄愈伤组织的产生和继代。以果皮诱导出的愈伤组织呈黄白色,质地松软、生长速度快,每 15 d 需继代 1 次,继代 3 次后便可用于悬浮培养。

表 1 不同培养基诱导的葡萄愈伤组织的形态

Table 1 Callus induced in different mediums

培养基类型 Medium	诱导率/% Inducement ratio	愈伤组织 Callus
I	100	块大,白色,致密 Big, white and dense
II	96.5	块小,红色,松软,有不定根 Small, red, soft and have adventitious root
III	95	块较大,白色,顶部泛红,松软 Biger, white and have faint red on the top,soft

2.2 葡萄悬浮培养基激素质量浓度的选择

2.2.1 NAA 质量浓度的选择 由表 2 可见,在 6-BA 质量浓度为 0.5 mg/L 的条件下,NAA 质量浓度过大不利于悬浮细胞的生长;NAA 质量浓度为 1.0 mg/L 时,培养 14 d 后收获量为 536 g/L,细胞质量浓度是初始接种量(200 g/L)的 2.7 倍,增殖倍数最大,由此确定 NAA 的最适质量浓度为 1.0 mg/L。

表 2 不同 NAA 质量浓度对巨峰葡萄悬浮细胞增殖的影响

Table 2 Proliferation of cell Kyoho in different NAA concentrations

试验序号 Serial number	6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	细胞收获量/(g · L ⁻¹) Harvest	增殖倍数 Multiplication
1	0.5	1.0	536	2.7
2	0.5	2.0	460	2.3
3	0.5	3.0	450	2.3
4	0.5	4.0	400	2.0
5	0.5	5.0	320	1.6
6	0.5	6.0	260	1.3

2.2.2 2,4-D 质量浓度的选择 由表 3 可见,在 6-BA 质量浓度为 0.5 mg/L 的条件下,1.0,1.5 和 2.0 mg/L 2,4-D 对葡萄悬浮细胞生长的影响差异

不大,培养 14 d 后细胞收获量均大于 530 g/L,增殖倍数为 2.7~2.8。表明 1.0~2.0 mg/L 2,4-D 均适宜于葡萄悬浮细胞的生长。

表 3 不同 2,4-D 质量浓度对巨峰葡萄悬浮细胞增殖的影响
Table 3 Proliferation of cell Kyoho in different 2,4-D concentrations

试验序号 NO.	6-BA/(mg · L ⁻¹)	2,4-D/(mg · L ⁻¹)	细胞收获量/(g · L ⁻¹) Harvest	增殖倍数 multiplication
1	0.5	0.5	402	2.0
2	0.5	1.0	544	2.7
3	0.5	1.5	535	2.7
4	0.5	2.0	553	2.8

2.2.3 6-BA 质量浓度的选择 由表 4 可见,在 NAA 质量浓度为 1.0 mg/L 时,添加 0.5~1.0 mg/L 6-BA 可以使细胞增殖为原来的 2.7~2.8

倍,收获量最高可达到 563 g/L,表明,0.5~1.0 mg/L 6-BA 均适合于液体悬浮培养葡萄细胞的增殖。

表 4 不同 6-BA 质量浓度对巨峰葡萄悬浮细胞增殖的影响
Table 4 Proliferation of cell Kyoho in different 6-BA concentrations

试验序号 NO.	NAA/(mg · L ⁻¹)	6-BA/(mg · L ⁻¹)	细胞收获量/(g · L ⁻¹) Harvest	增殖倍数 Multiplication
1	1.0	0.1	325	1.7
2	1.0	0.5	563	2.8
3	1.0	1.0	535	2.7
4	1.0	2.0	316	1.6

2.2.4 KT 质量浓度的选择 由表 5 可见,在 2,4-D 质量浓度为 1.0 mg/L 时,KT 的最适质量浓度为

0.2 mg/L,在此条件下悬浮细胞的收获量可达 566 g/L,细胞增殖了 2.8 倍。

表 5 不同 KT 质量浓度对巨峰葡萄悬浮细胞增殖的影响
Table 5 Proliferation of cell Kyoho in different KT concentrations

试验序号 NO.	2,4-D/(mg · L ⁻¹)	KT/(mg · L ⁻¹)	细胞收获量/(g · L ⁻¹) Harvest	增殖倍数 Multiplication
1	2.0	0.1	425	2.1
2	2.0	0.2	566	2.8
3	2.0	0.3	386	1.9
4	2.0	0.4	316	1.6

2.3 葡萄愈伤组织和悬浮细胞培养基蔗糖质量浓度及 pH 的选择

由表 6 和表 7 可知,固体培养与悬浮培养所需要的蔗糖质量浓度和 pH 基本一致;固体培养的最适 pH 为 5.5~6.0,在此 pH 范围内,蔗糖质量浓度为 20~40 g/L 处理间没有明显差异,愈伤组织生长快,周期短,基本无褐变发生;悬浮培养在 pH 为

5.5~6.0,蔗糖质量浓度为 30 g/L 时,悬浮细胞生长快,周期短,褐化轻。由于液体培养 B5 的 pH 值过大,易产生白色沉淀,因此将液体培养基的 pH 控制在 5.5~5.8 更为合适,蔗糖的最佳质量浓度为 30 g/L,浓度过小悬浮细胞生长较慢,过大则易褐变。

表 6 不同 pH 和蔗糖质量浓度下愈伤组织的生长状况
Table 6 Grape callus growth in various pH and different sucrose concentrations

pH	蔗糖质量浓度/(g · L ⁻¹) Sucrose concneration				
	10	20	30	40	50
5.0~5.4	1*	2*	2*	2*	1*
5.5~6.0	2*	3*	3*	3*	2*
6.1~6.5	1*	1*	2*	2*	2*

注:1*. 生长缓慢,褐化严重;2*. 生长周期较长,褐化较为严重;3*. 生长快,周期短,基本无褐化情况。
Note:1*. Growth slowly and browning heavily;2*. Longer period and have browning;3*. Growth fast,shorter period and have no brown-ing.

表 7 不同 pH 和蔗糖质量浓度下葡萄悬浮细胞的生长状况

pH	蔗糖质量浓度/(g·L ⁻¹) Sucrose concentration				
	10	20	30	40	50
5.0~5.4	1*	2*	2*	2*	1*
5.5~6.0	1*	2*	3*	2*	1*
6.1~6.5	1*	1*	2*	1*	1*

注:1*. 基本不生长,褐化死亡;2*. 生长周期较长,逐渐褐化;3*. 生长快,周期短,褐化轻。
Note:1*. Browning and died;2*. Longer period and browning gradually;3*. Growth fast,short period and slight browning.

2.4 葡萄悬浮培养基激素组合的选择

液体悬浮培养,对培养基激素质量浓度和激素组合的要求较为苛刻。本试验根据对培养基激素浓度的选择结果,经过多次预试验并参考文献[13-14]筛选出了 4 种培养基组合:

- I :B5+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖;
- II :B5+250 mg/L 水解酶蛋白+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖;
- III :B5+0.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖;
- IV :B5+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖。

以这 4 种培养基进行对照培养,结果见图 1。由图 1 可见,在接种量相同的条件下,I 和 II 号培养基中的悬浮细胞增殖量高于 III 和 IV 号培养基,且生长速度快,褐化程度小。表明 I 和 II 号培养基组合均适合巨峰葡萄细胞的生长。

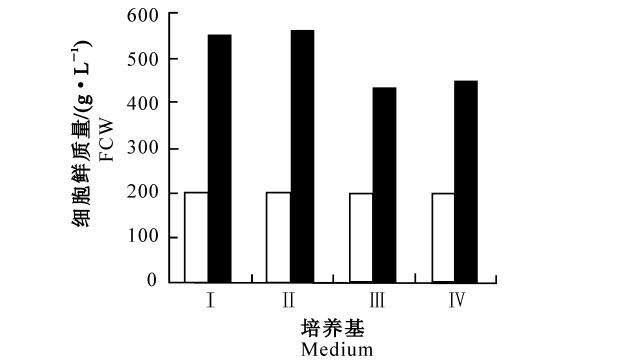


图 1 不同培养基类型对葡萄悬浮细胞增殖的影响
-□-, 接种时细胞鲜重; -■-, 14 d 后细胞鲜重
Fig. 1 Proliferation of grape cell in different mediums
-□-, FCW of inoculation; -■-, FCW after 14 days

2.5 葡萄悬浮培养接种量的选择

由不同初始接种量的细胞生长曲线(图 2)可以看出,每 40 mL 培养液初始接种量为 10~16 g,有利于悬浮细胞系的建立,接种量过小细胞难以生长或生长缓慢,接种量过大细胞生长周期过短,衰亡较

快。由图 3 可知,在继代过程中,每 40 mL 培养液接种 5~10 g(新旧培养基控制在 4:1~5:1)即可快速建立起生长稳定的巨峰葡萄细胞悬浮培养体系。

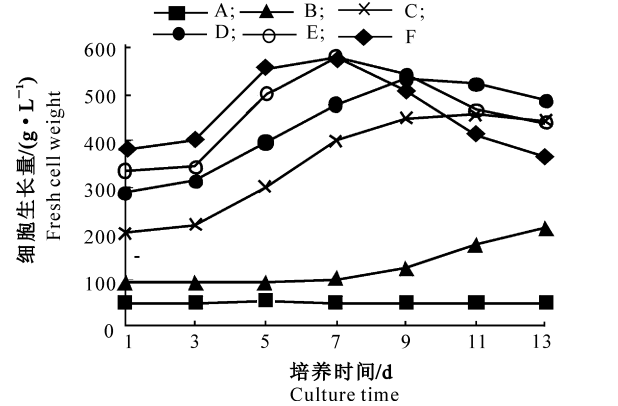


图 2 不同起始接种量对葡萄悬浮细胞增殖的影响
A~F. 愈伤组织起始质量浓度分别为 47.6,90.9,200.0,285.7,333.3 和 384.6 g/L

Fig. 2 Proliferation of grape cell in different original inculum sizes
A-F. The concentration of callus in culture medium is 47.6,90.9,200.0,285.7,333.3,384.6 g/L

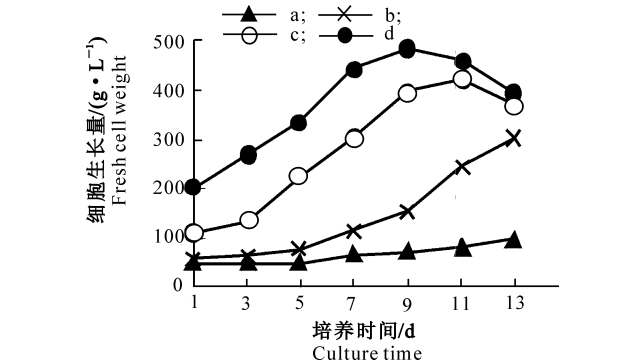


图 3 不同继代接种量对葡萄悬浮细胞增殖的影响
a~d. 悬浮细胞起始质量浓度分别为 47.6,58.5,111.0 和 200.0 g/L
Fig. 3 The proliferation of grape cell in different inculum sizes
a-d. The concentration of suspension cell in culture medium is 47.6,58.5,111.0,200.0 g/L

3 讨 论

合适的培养基及激素配比,是诱导产生疏松易碎的愈伤组织和建立悬浮体系的关键。在植物细胞培养中,常用的激素有生长素类激素和细胞分裂素类激素,其中生长素 IAA、NAA、2,4-D 等常用于诱导细胞的生长、分裂和根的分化;细胞分裂素类物质 KT、6-BA、ZT、TDZ 等常用于促进细胞分裂和由愈伤组织或器官分化不定芽。

在细胞培养过程中,不同的植物材料,不同的葡萄品种,甚至不同的培养方式所需要的激素质量浓度与组合是不同的。胡萍等^[18]研究发现,南方红豆杉悬浮培养的最佳激素组合为 3 g/L 水解酪蛋白、5 mg/L NAA 和 0.01 mg/L 6-BA。郑媛等^[19]在烟草的悬浮培养时选择的激素浓度组合为 0.1 mg/L NAA 和 0.5 mg/L 6-BA。葡萄细胞悬浮培养较葡萄愈伤组织的诱导对激素浓度和配比的要求更苛刻,激素浓度过大或过小均会导致悬浮细胞褐化或停止生长。本试验先对单个激素浓度进行了筛选,再在相同的培养条件下进行比较研究,结果表明以 1 mg/L NAA 和 0.5 mg/L 6-BA 进行激素组合,能够促进巨峰葡萄悬浮细胞的快速生长。本研究同时对 Zhang^[13]、曲均革等^[14]筛选的激素组合进行了试验,结果表明,适合酿酒葡萄悬浮培养的 250 mg/L CH、0.1 mg/L NAA 和 0.2 mg/L KT 组合,同样适合鲜食品种巨峰葡萄的悬浮培养。

在进行葡萄细胞的悬浮培养过程中,褐化现象一直是要攻克的最大难题。本试验在进行悬浮培养过程中也曾对减轻褐化的方法进行过探索,结果表明在愈伤组织的选取方面,一定要选取白色松软、生长分裂旺盛的愈伤组织,保证较高的活细胞率;在接种量的控制方面,初次接种量一定要大,继代时新旧培养基的体积比不能低于 1:5;细胞一旦进入平稳生长期就必须马上继代。如果发生了褐化可以进行转瓶处理,将底部大的组织团块和死亡的细胞弃去,转移到添加少量新鲜培养基的新瓶中。一定浓度的 PVP 对防止褐化也有一定作用,另外加入大孔吸附树脂进行固液两相培养对褐化的防止效果显著,但这 2 种方法可能不利于葡萄次生代谢物的积累。

4 结 论

本研究以巨峰葡萄果皮为材料,在 pH 为 5.5~6.0、蔗糖质量质量浓度为 20~40 g/L 的条件下,以 B5+250 mg/L 水解酪蛋白+0.1 mg/L NAA+0.2

mg/L KT+6 g/L 琼脂为培养基,能快速建立起适合葡萄愈伤组织生长的培养体系。在 pH 为 5.5~5.8 条件下,B5+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖和 B5+250 mg/L 水解酪蛋白+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖组成的液体培养基,均能快速建立起适合巨峰葡萄细胞生长的悬浮培养体系。在此条件下建立起来的悬浮细胞系,生长周期适宜(15 d 左右),褐化较轻,适合进行快繁或诱导处理。

[参考文献]

- [1] Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. Natural Products Report, 2003, 20: 288-303.
- [2] Dercks W, Creasy L L. The significance of stilbene phytoalexin in the plasmopara vi-ticola grapevine [J]. Interaction Physiol Mol Plant Pathol, 1989, 34(3): 189-202.
- [3] 孙敬三, 朱志清. 植物细胞工程实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
Sun J S, Zhu Z Q. The experiment technology of plant cell project [M]. BeiJing: Publishing Company of Chemisty Industry, 2006. (in Chinese).
- [4] 方文娟, 韩烈保, 曾会明. 植物细胞悬浮培养影响因子研究 [J]. 生物技术通报, 2005(5): 11-15.
Fang W J, Han L B, Zeng H M. Research advances in factors affecting establishment of plant cell suspension culture [J]. Biotechnology Bulletin, 2005(5): 11-15. (in Chinese)
- [5] 许凤芹, 刘桂茹, 杨学举. 植物组织培养研究进展 [J]. 河北农业科学, 2005, 9(1): 99-103.
Xu F Q, Liu G R, Yang X J. Research advances of plant tissue culture [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2005, 9(1): 99-103. (in Chinese)
- [6] 孔祥海. 植物次生代谢物的细胞培养技术研究进展 [J]. 龙岩学院学报, 2005, 23(6): 60-76.
Kong X H. Research progress of cell culture for plant secondary metabolites [J]. Journal of Longyan University, 2005, 23(6): 60-76. (in Chinese)
- [7] 徐忠东. 植物组织培养生产药物研究进展 [J]. 生物学杂志, 2001, 18(6): 13-14.
Xu Z D. Advances in the production of medicines by plant tissue cultures [J]. Journal of Biology, 2001, 18(6): 13-14. (in Chinese)
- [8] Negussic A. Induce more buds of junipers excelsa's tissue culture [J]. For Ecol manage, 1997, 98(2): 115-123.
- [9] Larronde F, Krisa S, Decendit A, et al. Regulation of polyphenol production in Vitis vinifera cell suspension cultures by sugars [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 946-950.