



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102577953 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201210030964. 1

(22) 申请日 2012. 02. 13

(71) 申请人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌东湖南路 7
号

(72) 发明人 黄文敏 刘永定 尹黎燕 胡征宇
毕永红

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.
A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种抑制烟草愈伤组织继代培养中褐化的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种抑制烟草愈伤组织继代过程中褐化的方法,其步骤:A、选取烟草种子萌发出的子叶为组织培养的外植体;B、通过平衡灭菌前培养基 pH 值和琼脂含量使培养基达到适合愈伤组织生长的最佳凝固效果;C、铁盐与微量元素分开灭菌;D、在培养基中加入 0.5g/LPVP,并使培养箱湿度控制在 18%-20%。该方法简单易行,操作方便,有效抑制了烟草愈伤组织继代过程中的褐变,效果好,烟草愈伤组织增殖系数可达到 11.29(倍);另外,该发明为烟草愈伤组织悬浮培养提供了优良的细胞种源。该方法培养的烟草愈伤组织松软,为获得分散均匀的悬浮细胞系提供了良好的条件。

1. 一种抑制烟草愈伤组织继代培养过程中褐化的方法,其步骤是:

A:配制 KCMS 培养基:培养基的成分组成及工作浓度如下:大量元素为:硝酸铵 1.65g/L、硝酸钾 1.9 g/L、二水合氯化钙 0.44 g/L、七水合硫酸镁 0.37 g/L、磷酸二氢钾 0.17 g/L;微量元素:碘化钾 0.83 mg/L、硼酸 6.2 mg/L、四水合硫酸锰 22.3 mg/L、七水合硫酸锌 8.6 mg/L、二水合锰酸钠 0.25 mg/L、五水合硫酸铜 0.025 mg/L、六水合氯化钴 0.025 mg/L;铁盐:七水合硫酸亚铁 27.8 mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 37.3 mg/L;肌醇 0.5 mg/L;维生素 B₁ 1.3 mg/L;激素:2,4-二氯苯氧乙酸 0.2mg/L、激动素 0.1 mg/L;聚乙烯基吡咯烷酮 0.5g/L;磷酸二氢钾 200 mg/L;琼脂 8-10g/L;蔗糖 30g/L;灭菌前将培养基 pH 值调节至 5.6-6;

B:KCMS 培养基灭菌:将 A 步骤中所述 KCMS 培养基成分分成三部分灭菌,三部分分别为铁盐:七水合硫酸铁 27.8 mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 37.3 mg/L;微量元素:碘化钾 0.83 mg/L、硼酸 6.2 mg/L、四水合硫酸锰 22.3 mg/L、七水合硫酸锌 8.6 mg/L、二水合锰酸钠 0.25 mg/L、五水合硫酸铜 0.025 mg/L、六水合氯化钴 0.025 mg/L 和 KCMS 培养基其他营养成分:大量元素、肌醇、维生素 B₁、2,4-二氯苯氧乙酸、激动素、聚乙烯基吡咯烷酮、磷酸二氢钾、琼脂和蔗糖,以上三部分 KCMS 培养基营养成分分别进行湿热灭菌,铁盐部分灭菌条件为 121.3°C 30min,微量元素部分灭菌条件为 121.3°C 30min, KCMS 培养基其他营养成分部分灭菌条件为 121.3°C 20min,灭菌完成后以上三部分 KCMS 培养基营养成分均冷却至 50-60°C,在无菌操作台上混合均匀,并分装至 100 mL 三角瓶,每瓶分装 20 mL KCMS 培养基;

C:待 B 步骤中 100 mL 三角瓶内 KCMS 培养基自然冷却至室温,并黑暗水平搁置 2-3 天后,将烟草愈伤组织转移到凝固好的 KCMS 培养基表面,放置在光照培养箱中培养,培养条件为:22-26h 黑暗,培养箱温度 24-26°C,培养箱湿度 18%-20%,20-24 天继代一次。

一种抑制烟草愈伤组织继代培养中褐化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物细胞工程技术领域,更具体涉及一种抑制烟草愈伤组织继代培养中褐化的方法。适用于烟草等茄科植物愈伤组织继代培养中褐化现象的抑制。

背景技术

[0002] 烟草是茄科烟草属的一年生草本植物,本属约有 60 种。原产于美洲和大洋洲,中国栽培 4 种:烟草、黄花烟草、光烟草和花烟草,其中烟草种植面积最大。烟草具有药用、工业用、保健美容等价值,其中卷烟是烟草的主要产品,从烟叶中提取的蛋白质其营养价值高于任何奶类的蛋白质,而烟碱有杀菌止血的功能,是医院必备的药品。在中国烟叶和卷烟的销量很大,是国家的高积累、高税率商品,在国民经济中占有重要的地位。此外,烟草作为植物组织培养的“模式植物”之一,在植物细胞工程的研究中占有重要地位。有关烟草组织和细胞培养有不少研究和报道。褐变这一在许多木本植物组培中常见的现象,也是烟草组织培养的一大障碍。褐变是指外植体在培养过程中,自身组织从表面培养基释放褐色物质,以致培养基逐渐变成褐色,外植体也随之进一步变褐而死亡的现象。为了提高组织培养的成功率及维持愈伤组织较高的新陈代谢活性,必须对褐变现象加以严格控制。

[0003] 目前,国内外针对烟草组织培养过程中褐变现象的发生及引起褐变的因素有一定研究和报道。烟草细胞继代培养过程中的褐化诱因可归结为两大因素:1. 材料的遗传基础及生长发育等内在因子;2. 培养方式及条件等外部因子。尽管引起烟草愈伤组织继代培养中褐变的因素很多,但如下这一点是清楚的:选择适宜的培养基,再配合使用一些抗氧化剂,调节外源激素的种类与含量,在适宜的温度及黑暗中培养,方能使愈伤组织处于旺盛生长状态,且能够有效地控制褐变。我们研究发现,固体培养基的凝固情况对愈伤材料生长的影响较大。如果培养基偏软,植物愈伤材料会因沉入培养基中造成缺氧,胞内多酚氧化酶被激活,细胞里的酚类物质氧化成棕褐色的醌类物质,这种致死性的褐化物向外扩散致使培养基逐渐变成褐色,最终愈伤组织生长不好,直至死亡。如果培养基偏硬,则植物材料吸收水分和养分困难,同样生长不好。培养基的凝固状况(体现为软硬度)与琼脂用量和培养基的 pH 值有关。在实际操作过程中,培养基的 pH 值都是在灭菌前调至预定值的,但高温灭菌后由于培养基营养成分发生化学变化,会导致培养基的 pH 值也随之改变,这是造成高温灭菌后固体培养基凝固不好、甚至不凝固的主要原因之一。调高培养基 pH 值或增加琼脂用量均可改善培养基的凝固效果。因此在配制培养基时琼脂的用量、培养基灭菌前 pH 值的设定以及灭菌时如何控制培养基成分的有效性及各营养成分的顺序都是抑制烟草愈伤组织继代培养褐化的关键。另外,向培养基中加入适量吸附剂聚乙烯基吡咯烷酮(PVP),以吸收愈伤组织生长过程中产生的有毒物质也是抑制烟草愈伤组织继代过程中褐化的一个新思路。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种抑制烟草愈伤组织继代培养过程中褐化的方法。方法简单易行,操作方便,有效抑制了烟草愈伤组织继代过程中的褐变,效果好,烟草愈伤组织

增殖率可达 11.29 (倍);另外,该发明为烟草愈伤组织悬浮培养提供了优良的细胞种源。该方法培养的烟草愈伤组织松软,为获得分散均匀的悬浮细胞系提供了良好的条件。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采用了以下技术措施:

[0006] 一种抑制烟草愈伤组织继代培养过程中褐化的方法,其步骤是:

[0007] A:配制 KCMS 培养基。培养基的成分组成及工作浓度如下:大量元素为:硝酸铵 (NH_4NO_3) 1.65g/L、硝酸钾 (KNO_3) 1.9g/L、二水合氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.44g/L、七水合硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.37g/L、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.17g/L;微量元素:碘化钾 (KI) 0.83mg/L、硼酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L、四水合硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L、七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6mg/L、二水合锰酸钠 ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L、五水合硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L、六水合氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L;铁盐:七水合硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.3mg/L;肌醇 0.5mg/L;维生素 B_1 1.3mg/L;2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 0.2mg/L、激动素 (KT) 0.1mg/L;聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP) 0.5g/L;磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 200mg/L;琼脂 8-10g/L;蔗糖 30g/L。灭菌前将培养基 pH 调节至 5.6-6。

[0008] B:KCMS 培养基灭菌:将 A 步骤中所述 KCMS 培养基成分分成三部分独立灭菌。三部分分别为铁盐 (七水合硫酸铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.3mg/L)、微量元素 (碘化钾 (KI) 0.83mg/L、硼酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L、四水合硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L、七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6mg/L、二水合锰酸钠 ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L、五水合硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L、六水合氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L) 和 KCMS 培养基其他营养成分 (大量元素、肌醇、维生素 B_1 、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、激动素 (KT)、聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、琼脂和蔗糖)。以上三部分 KCMS 培养基营养成分分别进行湿热灭菌。铁盐部分灭菌条件为 121.3°C 30min,微量元素部分灭菌条件为 121.3°C 30min, KCMS 培养基其他营养成分灭菌条件为 121.3°C 20min。灭菌完成后待以上三部分 KCMS 培养基营养成分均冷却至 50-60°C,在无菌操作台上将它们混合均匀,并分装至 100mL 锥形瓶 (锥形瓶提前 121.3°C 灭菌 30min),每瓶分装 20mL KCMS 培养基。

[0009] C:待 B 步骤中 100mL 三角瓶内 KCMS 培养基自然冷却至室温 (20-25°C,以下相同)并黑暗水平搁置 2-3 天后,可将烟草愈伤组织转移到凝固好的 KCMS 培养基表面,放置在光照培养箱中培养。培养条件为:22-26h 黑暗,培养箱温度 24-26°C,培养箱湿度 18%-20%。20-24 天继代一次。此方法下培养的烟草愈伤组织生长分裂旺盛,增殖率可达 11.29 (倍)。全过程中培养基始终维持亮黄色,表明烟草愈伤组织向培养基中分泌的有毒褐化物质少,褐化现象得到明显的抑制;此外,新分裂形成的烟草愈伤组织为乳白色且松软,利于进行下一代转接。

[0010] 本发明具有如下的优点和效果:

[0011] 1. 有关本发明的效果请见下表:

[0012]

方法 \ 项目	材料颜色	材料状态	材料褐化	悬浮培养	增殖率 (增重倍数)	培养基状态
本方法	乳白-浅黄	松软	轻, 继代26天出现褐化	悬浮细胞分散均匀, 颗粒细小	11.29	亮黄色, 弹性适中
常规方法	黄-白	紧实	重, 继代10-12天出现褐化	悬浮细胞成团	5.64	白色, 较坚硬

[0013] 2. 本发明无需增加专用设备, 操作方便, 有效抑制了烟草愈伤组织继代过程中的褐化, 则大大保证了烟草愈伤组织培养的成功率; 同时该方法也促进了烟草愈伤组织的快速生长。

[0014] 3. 本发明中获得的烟草愈伤组织松软, 可为液体悬浮培养模式提供优良的细胞种源。主要体现在本方法下获得的烟草愈伤组织经过液体悬浮培养时能分散均匀, 不黏粘成团; 并且仅 5-8 个烟草细胞构成 1 个颗粒, 故颗粒细小。这样不仅保证了烟草细胞与培养基中营养成分的有效接触, 也保证了烟草细胞生长的同步性。因此, 无论是作为科研材料还是用于工厂化大规模培养以提取烟碱等的烟草细胞种源, 都是最佳选择。

具体实施方式

[0015] 实施例 1:

[0016] 下面对本发明的实施例作进一步详细描述:

[0017] 一种抑制烟草愈伤组织继代过程中褐化的方法, 它采用如下步骤:

[0018] 步骤一: 以烟草种子播种后萌发出的子叶为外植体, 用体积比为 75% 的酒精浸泡 20 或 24 或 26 或 28 或 30s 后, 再用质量体积比为 0.1% 的氯化汞消毒 6 或 7 分钟, 用无菌水冲洗 8 或 9 或 10 次。

[0019] 步骤二: 配制 MS 固体培养基 (大量元素: 硝酸铵 (NH_4NO_3) 1.65g/L、硝酸钾 (KNO_3) 1.9g/L、二水合氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.44g/L、七水合硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.37g/L、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.17g/L; 微量元素: 碘化钾 (KI) 0.83mg/L、硼酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L、四水合硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L、七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6mg/L、二水合锰酸钠 ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L、五水合硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L、六水合氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L; 铁盐: 七水合硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.3mg/L; 有机物质: 肌醇 0.1g/L、烟酸 0.5mg/L、维生素 B_6 0.5mg/L、维生素 B_1 0.1mg/L、甘氨酸 2.0mg/L; 蔗糖: 30g/L; 琼脂: 7g/L)。将 MS 培养基湿热灭菌 (121.3°C, 灭菌 20min) 并冷却至室温后, 将步骤一中消毒好的烟草种子转移到 MS 培养基中培养。

[0020] 步骤三: 此过程在无菌条件下完成: 取步骤二中生长 20d 后的烟草子叶切成 1mm 左右, 在以下培养基中诱导烟草愈伤组织: 大量元素: 硝酸铵 (NH_4NO_3) 1.65g/L、硝酸钾 (KNO_3) 1.9g/L、二水合氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.44g/L、七水合硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.37g/L、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.17g/L; 微量元素: 碘化钾 (KI) 0.83mg/L、硼酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L、

四水合硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L、七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6mg/L、二水合锰酸钠 ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L、五水合硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L、六水合氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L ; 铁盐 : 七水合硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.3mg/L ; 有机物质 : 肌醇 0.1g/L、烟酸 0.5mg/L、维生素 B_6 0.5mg/L、维生素 B_1 0.1mg/L、甘氨酸 2.0mg/L ; 激素 : 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 0.5mg/L、激动素 (KT) 0.05mg/L ; 葡萄糖 2% (质量体积比) ; 琼脂 7g/L。本步骤中培养基 pH 值调节到 5.6, 培养条件为 25℃, 14 小时光照, 光强 $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

[0021] 步骤四 : 配制 KCMS 培养基。培养基的成分组成及工作浓度如下 : 大量元素 : 硝酸铵 (NH_4NO_3) 1.65g/L、硝酸钾 (KNO_3) 1.9g/L、二水合氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.44g/L、七水合硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.37g/L、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.17g/L ; 微量元素 : 碘化钾 (KI) 0.83mg/L、硼酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L、四水合硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L、七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6mg/L、二水合锰酸钠 ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L、五水合硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L、六水合氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L ; 铁盐 : 七水合硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.3mg/L ; 肌醇 0.5mg/L ; 维生素 B_1 1.3mg/L ; 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 0.2mg/L、激动素 (KT) 0.1mg/L ; 聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP) 0.5g/L ; 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 200mg/L ; 琼脂 8-10g/L ; 蔗糖 30g/L。灭菌前将培养基 pH 调节至 5.8。

[0022] 步骤五 : KCMS 培养基灭菌。将步骤四中所述 KCMS 培养基成分分成三部分独立灭菌。三部分分别为铁盐 (七水合硫酸铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L、二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.3mg/L)、微量元素 (碘化钾 (KI) 0.83mg/L、硼酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L、四水合硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L、七水合硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6mg/L、二水合锰酸钠 ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L、五水合硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L、六水合氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L) 和 KCMS 培养基其他营养成分 (大量元素、肌醇、维生素 B_1 、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、激动素 (KT)、聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、琼脂和蔗糖 - 各成分工作浓度请见步骤四)。以上三部分 KCMS 培养基营养成分分别进行湿热灭菌。铁盐部分灭菌条件为 121.3℃ 30min, 微量元素部分灭菌条件为 121.3℃ 30min, KCMS 培养基其他营养成分部分灭菌条件为 121.3℃ 20min。灭菌完成待以上三部分 KCMS 培养基营养成分均冷却至 50 或 52 或 54 或 56 或 58 或 60℃ 后在无菌操作台上将它们混合均匀, 并分装至 100mL 三角瓶, 每瓶分装 20mL KCMS 培养基。

[0023] 步骤六 : 待步骤五中 100mL 三角瓶内 KCMS 培养基自然冷却至室温并黑暗水平搁置 2 或 4 天后, 将步骤三中诱导形成的烟草愈伤组织转移到凝固好的 KCMS 培养基表面, 放置在光照培养箱中培养。培养条件为 : 24h 黑暗, 培养箱温度 25℃, 培养箱湿度 18% - 20%, 20 或 21 或 22 或 23 或 24 天继代一次。

[0024] 实验例 :

[0025] 经实验证实, 常规方法诱导出的烟草愈伤组织增殖过程中的褐化率为 52.4%, 本方法中的烟草愈伤组织的褐变率为 12.1%。