

·综述·

植物悬浮细胞的研究进展

杨帆, 赵君*, 张之为, 娜仁

(内蒙古农业大学农学院, 中国内蒙古呼和浩特 010018)

摘要: 综述了植物悬浮细胞培养的原理、培养类型、不同植物悬浮细胞培养基的配方和培养方法。同时阐述了悬浮细胞系在细胞生物学和分子生物学领域中的应用前景。

关键词: 植物; 悬浮细胞; 悬浮培养

中图分类号: Q31

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)03-0257-06

Advances in Plant Suspension Cells

YANG Fan, ZHAO Jun*, ZHANG Zhi-wei, NA Ren

(College of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China)

Abstract: Advances in the principles of culturing plant suspension cells and its cultivated types, different formulations for the cultivation medium and cultivation methods were reviewed. At the same time, the applications of suspension cell lines in the cell biology and molecular biology aspects were also presented.

Key words: plants; suspension cells; suspension culture

(Life Science Research, 2010, 14(3): 257~262)

植物细胞悬浮培养 (cell suspension culture) 是一种在受到不断搅动或摇动的液体培养基里培养单细胞及小细胞团的培养系统, 是植物细胞生长的微生物化。高等植物是多细胞的有机体, 在整体水平上进行遗传操作比较困难, 只有通过离体培养使植物细胞或小块的组织在离体培养条件下生长、发育和分化、再生为完整植株, 使细胞水平上的遗传操作传递到植物体的细胞内, 从而实现植物的品种改良。植物的根、茎、叶、下胚轴、子叶、叶柄等组织均能通过组织培养诱导出愈伤组织, 并且能够通过器官发生途径或胚状体途径再生植株。愈伤组织可以在液体振荡条件下获得悬浮细胞, 悬浮细胞在固体培养条件下还可重新获得愈伤组织。悬浮细胞由于其分散性好, 细胞形状及细胞团大小大致相同, 而且生长

迅速, 重复性好, 易于控制, 所以被广泛用于生理学、细胞学、生物化学、发育生物学、遗传学、分子生物学的研究。因此, 悬浮细胞培养已成为植物生物技术中最有用的研究手段之一^[1]。

1 悬浮培养的类型

悬浮培养依据其培养方式可分为两种类型, 即分批培养和连续培养。

分批培养(batch culture)是把细胞分散在一定容积的培养基中进行培养, 目的是获得细胞悬浮培养物。培养过程中只有气体和挥发性代谢产物可以同外界空气交换。当培养基中的主要营养物质耗尽时, 细胞的分裂和生长即行停止。为了使分批培养的细胞能不断增殖, 必须进行继代培养。在分批培养中, 由于细胞培养基的成分不断

收稿日期: 2009-11-17; 修回日期: 2010-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30760132)

作者简介: 杨帆(1985-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理研究, E-mail: 00y00f@163.com; *通讯作者: 赵君(1969-), 女, 内蒙古包头人, 内蒙古农业大学农学院教授, 博士, 主要从事分子植物病理研究, Tel: 0471-4308736, E-mail: zhaojun02@hotmail.com.

改变,虽然在短暂的指数生长期内细胞数目可以加倍,但由于细胞缺乏一个稳态生长期,因此,其代谢物和酶的浓度不能保持恒定.所以它不是一种理想的研究细胞生长和代谢的手段^[2].

连续培养(continuous culture)是利用特制的培养容器进行大规模的细胞培养.在连续培养中,由于不断注入新鲜培养基,排掉用过的培养基,在培养物的容积保持恒定的情况下,培养液中的营养物质能够不断地得到补充.连续培养是植物细胞培养技术中的一项重要进展,它对于植物细胞代谢调节机理、生长限制因子对细胞生长影响以及大量生产细胞培养过程中次生物质的形成等研究都有一定的意义^[2].

2 悬浮细胞培养的不同步化

细胞分裂周期由分裂间期和分裂期组成,细胞分裂的发生并不是人们设想的那样从某一点同时开始步调一致地完成分裂周期的各个时期,而是随机的.因此,一个培养体系中的细胞由处于不同分裂时期的细胞所组成,即是不同步的.这对于细胞分裂和代谢机制的研究、大规模生产次生代谢产物都是不利的.为了使培养细胞同步化,研究人员进行了物理方法和化学方法的各种尝试.

物理方法:通过对细胞的物理特性即细胞或细胞团的大小和生长环境的条件如光照、温度等进行控制,实现细胞的同步化.如按细胞团大小进行选择并分别培养及低温休克的方法培养细胞都可以使得细胞的生长达到同步化.

化学方法:使细胞受到某种营养饥饿或是用某种因素抑制细胞分裂而达到细胞生长的同步化,这也就是所谓的饥饿法和抑制法.饥饿法:这种方法是在培养过程中,先停止供应细胞分裂所必需的一种营养物质或激素,使细胞停止在G1或G2期,经一段时间饥饿后,向培养基重新加入这种限制因子,静止的细胞就会同步进入分裂.如在长春花细胞悬浮培养中,先使细胞受到磷酸盐饥饿4d,然后转移到含磷酸盐的培养基中,获得了细胞生长的同步化^[1].抑制法:使用DNA合成抑制剂如5-氨基尿嘧啶、羟基脲、胸腺嘧啶脱氧核苷,使细胞内DNA合成受到抑制,细胞分裂只能停滞在G1和S期的边界上,当把这些抑制剂去掉后,细胞即进入同步化分裂.不过用这种方法取得的同步性只能保持一个细胞

周期^[1].

3 细胞悬浮培养的培养基

在植物的组织培养中,MS(1/2 MS)培养基和B₅液体培养基是研究人员常使用的基本培养基.基本培养基可以提供细胞生长所需的大量和微量元素以及碳源,能用来培养生长快、易散碎的愈伤组织,一般来说也同样可以用于该物种的悬浮培养.除基本培养基外,添加适当的外源激素可以促使细胞启动细胞分裂、促使愈伤组织生长以及根、芽的分化等.用于组织培养的激素主要分为两大类:生长素和细胞分裂素.生长素类激素萘乙酸(NAA)促进细胞的分裂和扩大,二氯苯氧乙酸(2,4-D)能够十分有效的促进愈伤组织的增殖.细胞分裂素如激动素(KT, Kinetin)、6-苄基嘌呤(6-BA)可以启动有丝分裂,诱导细胞的增殖和愈伤组织的分化.为了提高细胞的分散程度,生长素和细胞分裂素的浓度和比例需要进行一些调节.以下是几种植物悬浮细胞的常用的培养基组分:

拟南芥的悬浮细胞的培养,常利用30 g/L蔗糖,添加0.2 mg/L NAA^[3]或1 mg/L 2,4-D^[4]的Gamborg's B₅培养基.添加激素NAA 0.25~0.5 mg/L及KT 0.05 mg/L的Gamborg's B₅培养基,最适于拟南芥悬浮细胞的生长^[5].蔗糖浓度对拟南芥悬浮细胞生长有明显的影响,以30 g/L蔗糖浓度表现最好^[6].

烟草的悬浮细胞培养可以利用15 g/L蔗糖浓度,添加0.2 mg/L 2,4-D的MS培养基^[7],也可以以LS为基本培养基,附加15 g/L酵母膏和3 g/L的蔗糖^[8].最新的研究结果表明用MS培养基,加入30 g/L的蔗糖,200 mg/L KH₂PO₄, 2.5 mg/L 硫胺素,50 mg/L 肌醇和0.2 mg/L 2,4-D也适于烟草悬浮细胞的生长^[9].

水稻的悬浮细胞培养基也有很多种. MS培养基加入2 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L 6-BA和5 mg/L Vc^[10]. N₆培养基也可以作为水稻悬浮细胞的基本成分,需要添加1 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L KT^[11];而添加NAA 1.5 mg/L和KT 0.4 mg/L的N₆培养基也可作为培养水稻悬浮细胞的最佳培养基^[12].

马铃薯的悬浮细胞培养,可用MS培养基添加3 mg/L NAA, 0.2 mg/L KT和30 g/L蔗糖^[13].而在培养基中加入NH₄NO₃可以防止细胞聚集成

团。组成为 MS 培养基添加 2 mg/L 2, 4-D、1 mg/L NAA、250 mg/L CH(水解酪蛋白)、30 g/L 蔗糖的液体培养基也可以作为培养马铃薯悬浮细胞的非常好的培养基^[14]。

4 悬浮细胞的培养方法

一般色泽新鲜、生长旺盛、质地疏松且增殖率高的淡黄色愈伤组织可以用来获得悬浮细胞系。处于这种状态下的愈伤组织生长迅速、易于分散、在悬浮培养基中分散程度好,单细胞多,细胞分裂旺盛,细胞体积较小,适合进行悬浮培养以获得悬浮细胞系。取愈伤组织 0.5~1.0 g,在无菌操作条件下,破碎成小块之后接种于装有液体培养基的锥形瓶中,在 25±2 °C 散射光或黑暗的培养室中,置于 120 r/min 旋转式摇床上震荡培养,悬浮细胞一般的生长周期为 1~2 周左右,每 5~7 d 需要继代一次^[2]。

植物悬浮细胞系生长曲线呈典型的 S 型。在一个生长周期中包括了延迟期、对数生长期、减慢期和静止期这几个时期。经过短暂的延迟期后,细胞进入为期一周左右的对数生长期,在这一时期细胞数量急剧增加,当生长进行到第 9 d 的时候达到峰值,之后细胞数量的变化不太明显为减慢期,最后进入生长的静止期,大约 3 d 后由于瓶内培养液中的营养成分已在细胞代谢的过程中被大量消耗,导致细胞数量呈现缓慢下降的趋势,至第 13 d 时,培养液中的细胞数量与最后一次继代后的细胞悬浮液中细胞数基本持平^[15]。

悬浮培养物继代的方法有多种,如吸取法、静止法和瓶壁法等。吸取法通过吸取培养瓶中不同层次的培养物获得生长状态不同的悬浮细胞。吸取中间培养物进行继代培养可以获得均一性好的单细胞或细胞团的悬浮细胞系,但这些细胞增殖较慢,因此在培养的初期不适宜使用此方法。而吸取底部培养物继代,细胞团较大,悬浮细胞团生长较快,往往接种后 2~3 d 就进入对数生长期,容易产生较大的细胞团。静止法相对于吸取法来讲,接种的悬浮细胞团小,生长速度也较快,接种后第 4~5 d 便进入生长期,细胞团数目明显地多于吸取法,但悬浮培养物颗粒不如吸取法均匀。在植物细胞悬浮振荡培养过程中,植物细胞也具有贴壁生长的现象,瓶壁法是利用植物细胞培养这一现象的继代方法。有人认为瓶壁

上的细胞生活力旺盛,还有人认为瓶壁细胞分散性程度好,单细胞频率高,因此,瓶壁法可获得高频率的、均一性好的单细胞悬浮细胞系^[16]。

在悬浮细胞培养体系中,接种初期的细胞起始密度对细胞的生长非常重要。悬浮细胞的起始密度一般在(0.5~2.5)×10⁵/mL。只有当起始细胞密度超过细胞生长的某一临界密度时培养细胞才能生长^[2],但由于过多的细胞会消耗大量的养分,因此选择既能使细胞达到最大的生长速率,又不会引起养分浪费的适接种量是悬浮细胞培养过程中一个重要的因素。

继代培养时不同稀释倍数对培养物的生物量有很大影响,低稀释倍数(即高接种量)能获得更大的生物量,而高稀释倍数(即低接种量)不利于培养物生长。当稀释倍数高至 1/20 (2.5 mL/50 mL)时,悬浮细胞生物量增长十分缓慢,基本处于生长停滞状态^[2]。在液体培养条件下,细胞间仍然存在物质及信号的交换,起始培养的细胞密度过低,即使前期有一定生长,但由于生长代谢积累的有害物质,将会抑制细胞的进一步生长,甚至会出现细胞死亡^[5]。所以,一个成功的悬浮细胞培养体系必须满足 3 个条件,即悬浮培养物分散性良好,细胞团较小,一般在 30~50 个细胞以下(在实际培养中很少有完全由单细胞组成的植物细胞悬浮系);悬浮系的均一性要好,细胞形状和细胞团大小大致相同,悬浮系外观为大小均一的小颗粒,培养基清澈透亮,细胞色泽呈鲜艳的乳白或淡黄色;悬浮细胞生长迅速,其生长量一般 2~3 d 甚至更短时间便可增加一倍^[5]。

5 悬浮培养中细胞生长量的计算和活性的鉴定

5.1 细胞生长量的计算

细胞计数:利用 5% 铬酸或 0.25% 果胶酶使悬浮细胞团分散。然后用血球计数板进行计数。也可以取悬浮细胞液用中性红进行染色,然后置于细胞计数器上,用显微镜进行观察计数。

细胞密实体积(PCV):将体积已知、均匀分散的悬浮液放入一个 15 mL 的离心管中,2 000 r/min 下离心,用每毫升培养液中细胞总体积的毫升数表示细胞的密实体积。

细胞鲜重:细胞培养物过滤,洗去培养基后真空抽滤,然后称重。

细胞干重:一般将细胞于 60 °C 干燥 12 h 后

称重. 以每毫升培养物或 10^6 个细胞的重量表示.

培养液中可溶性糖含量的测定: 一般采用蒽酮法来测定培养基中可溶性糖的变化^[17]. 糖在植物的生长过程中, 主要起到了提供碳源的作用. 培养基中的糖在浓硫酸作用下, 可经脱水反应生成糠醛或羟甲基糠醛, 生成的糠醛或羟甲基糠醛可与蒽酮反应生成蓝绿色糠醛衍生物, 在一定范围内可以用颜色深浅代表含糖量(成正比).

悬浮细胞增殖倍数与继代指数的测算^[6]:

悬浮细胞在生长过程中, 可以利用公式来计算细胞的增殖倍数与继代指数, 即:

增殖倍数 = 继代后悬浮细胞密度 / 接种时悬浮细胞密度

继代指数 = 继代后悬浮细胞密度 / 超始悬浮细胞(母液)密度. 即继代指数 = 增殖倍数 \times 稀释倍数.

在悬浮细胞制备与保持时, 要维持悬浮细胞正常稳定生长, 应当使每个继代周期的继代指数达到或接近 1, 细胞密度以单位体积悬浮细胞生物量(鲜重)表示, 稀释倍数以接种量(体积) / 继代培养悬浮细胞总体积来表示.

5.2 悬浮细胞活性的测定

TTC(氯化三苯基四氮唑)法^[18]: 该法利用活细胞呼吸所产生的 NADH_2 和 NADPH_2 催化渗透到细胞内的 TTC, 使其还原生成红色的 TTF(三苯基甲脞), 通过观察其显色反应和提取 TTF 分别定性和定量衡量细胞的活性.

相差显微术法: 在显微镜下, 观察细胞质环流和细胞核存在与否判断细胞的活力. 具有活力的细胞往往有细胞核和正常的环流.

FDA(荧光素双醋酸酯)法: FDA 本身不具有极性, 不能发出荧光, 可以自由出入细胞膜. 在活细胞中, FDA 被酯酶裂解, 释放出有极性的荧光素. 荧光素不能自由穿越质膜, 只能在活细胞中积累. 当以紫外光照射时, 活细胞中的荧光素可以发出绿色荧光, 以此可以区别活细胞和死细胞.

伊凡蓝法: 当以伊凡蓝(Evan's blue)的稀薄溶液(0.025%)对细胞进行处理时, 只有受损的细胞能够摄取伊凡蓝, 因此凡染蓝色的细胞往往是不具有活力的细胞.

此外在某些特定的情况下, 还需要对悬浮细胞进行细胞悬浮液 pH 值的测定以及 SOD(超氧化物歧化酶)和 CAT(过氧化氢酶)的活性测定等.

6 悬浮细胞系的应用

依据悬浮细胞系的特点, 它的应用主要有以下几点:

1) 选择突变体. 离体的单倍体细胞可以提供一种突变体选择系统, 在很小的空间就可以操作大量潜在的植株. 通过单细胞的培养, 可以在细胞水平上筛选出合乎需要的突变细胞系, 然后再生成具备理想特性的植株. 如: 王小军等^[19]对八倍体小黑麦进行了耐盐细胞系的筛选, 他们将八倍体小黑麦成对的单倍体和双倍体细胞系, 在 1%、1.5% 和 2% NaCl 水平上逐级筛选, 最后获得了耐 2% NaCl 的稳定的耐盐系. 林定波等^[20]曾以羟脯氨酸作为选择压, 筛选得了抗寒的柑橘植株. 迄今在经过诱变处理和未经诱变处理的选择实验中, 都已经分离出了大量的突变细胞系.

2) 生产天然的植物成分. 悬浮培养物的某些次生化合物含量往往比植物体高出 2~5 倍. 人们通过植物细胞的离体培养来生产这些化合物, 或是利用培养细胞对外供的前体化合物或中间产物进行生物转化. 长春花的细胞和愈伤组织培养物能合成高浓度的利血平和阿吗灵^[2]. 洋紫苏的悬浮培养物能累积一种数量可高达细胞干重的 15% 的生物碱. 悬浮细胞中的这种生物碱的浓度比植株中的含量高出 5 倍^[2]. 生物转化是利用细胞培养物给细胞提供一般情况下植物所不具备的底物化合物, 或者提供植物天然产物的中间体, 以期提高天然化合物产量.

3) 原生质体分离、培养与杂交. 悬浮细胞是分离原生质体较理想的材料. 将悬浮细胞放入含有纤维素酶、果胶酶以及 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、甘露醇的酶混合液中, 置于摇床上进行消化, 而后进行过滤离心即可获得原生质体^[21]. 据报道, 较为松散的悬浮细胞系能分离到较多有活力的原生质体, 进而能得到较多的原生质体植株. 原生质体经过诱导可形成愈伤组织, 分化培养愈伤组织就可得到再生植株了^[22]. 原生质体的融合又称体细胞杂交, 是将分离得到的不同亲本的原生质体, 在人工控制下, 像性细胞受精作用那样互相融合成一体. 这种方法可以培育出人们所期望的、性状优异的新品种, 对于植物的遗传改良具有重要的意义^[2].

4) 细胞生物学研究的工具. 目前, 人们利用悬浮细胞进行多方面的细胞生物学方面的研

究。如:可以在烟草悬浮细胞中表达一种可以避免移植排斥的IgG抗体,研究这种抗体在悬浮细胞中的亚细胞定位和糖基化^[9]。刘璞等利用烟草悬浮细胞,研究表明了cAMP参与了烟草悬浮细胞的ABA信号转导^[23]。费一楠等利用烟草的悬浮细胞证实了细胞核及核骨架中存在有肌动蛋白和肌球蛋白^[24]。拟南芥和烟草的悬浮细胞曾被用于研究矿物质等其它物质对其生长的影响^[5,7],细胞程序化死亡的机制^[4]等。Eugenia等利用马铃薯悬浮细胞系研究在病原菌的激发下细胞内的多蛋白桥连因子StMBF1的磷酸化,从而对研究马铃薯防御机制具有一定的参考价值^[13]。有报道提出用轮枝胞或镰刀菌处理拟南芥悬浮细胞,研究悬浮细胞在病原菌的激发下,活性氧的产生情况、离子电流的变化、细胞骨架和核仁的改变等早期生理应答反应^[25-27]。Leone等曾利用马铃薯悬浮细胞研究在低水势胁迫下,压力调节相关基因表达的动态变化^[28]。拟南芥悬浮细胞也曾被用于研究其在高温胁迫下基因的表达情况^[29],而低温可以诱导磷脂酶途径的活化进而引起拟南芥基因的变化^[30]。

总之,悬浮细胞在研究植物遗传转化、体细胞胚胎发生、人工诱变、生物反应器等方面有巨大的应用潜力和前景,因此基于悬浮细胞培养进行细胞和分子生物学的研究,已成为人们研究的热点。

参考文献(References):

- [1] 孙敬三. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京: 科学出版社(SUN Jing-san. Experimental Technique of Plant Cell Engineering[M]. Beijing: Science Press), 1995. 35-83.
- [2] 李浚明, 朱登云. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社(LI Jun-ming, ZHU Deng-yun. The Course of Plant Tissue Culture[M]. Beijing: China Agriculture University Press), 2005. 80-100.
- [3] RAYNAUD C, SOZZANI R, GLAB N, *et al.* Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen(PCNA)in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2006, 47(30): 395-407.
- [4] DUVAL I, BROCHU V, SIMARD M, *et al.* Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells[J]. *Planta*, 2005, 222(5): 820-831.
- [5] 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(ZOU Hong-bo. Establishment of *Arabidopsis* Suspension Cell Line and the Effect of Selenium on *Arabidopsis thaliana*[D]. Changsha: Hunan University), 2007. 13-22.
- [6] 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(LI Jian-an, HU Fang-ming. Subculture conditions and growth characteristics of *Arabidopsis* suspension culture[J]. *Nonwood Forest Research*), 2006, 24(1): 26-29.
- [7] 李艳红, 马小娟, 柴小清. H₂O₂ 诱导烟草悬浮细胞的凋亡[J]. 首都师范大学学报(自然科学版)(LI Yan-hong, MA Xiao-juan, CHAI Xiao-qing. H₂O₂ induces apoptosis of tobacco suspension cells[J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*), 2002, 23(4): 60-63.
- [8] 康超亮, 穆虹, 徐凤彩. 从烟草悬浮细胞制备辅酶 Q₁₀ 的初步研究[J]. 华南农业大学学报(KANG Chao-liang, MU Hong, XU Feng-cai. Studies on the preparation of coenzyme Q₁₀ from tobacco cells in suspension culture[J]. *Journal of South China Agriculture University*), 1999, 20(4): 59-64.
- [9] De MUYNCK B, NAVARRE C, NIZET Y, *et al.* Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells[J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(3): 467-482.
- [10] 曾富华, 易克, 徐向丽. 不同诱导处理后水稻悬浮细胞的活性氧变化与有关酶系的关系[J]. 作物学报(ZENG Fu-hua, YI Ke, XU Xiang-li. Relationship between the changes of active oxygen species and defense enzymes in suspension cultured cells treated by different inducers[J]. *Acta Agronomica Sinica*), 2005, 31(1): 18-23.
- [11] 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)(YUAN Li-yong, LI Shao-qing, LI Yang-sheng, *et al.* The establishment of cell suspension culture of rice[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*), 2003, 25(4): 373-376.
- [12] 贝丽霞. 激素对水稻悬浮细胞生长速率的影响[J]. 中国农学通报(BEI Li-xia. A study on the influences of hormones on suspension cell growth rate in rice[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*), 1998, 14(2): 24-25.
- [13] ZANETTI M E, BLANCO F A, DALEO G R, *et al.* Phosphorylation of a member of the MBF1 transcriptional co-activator family, StMBF1, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(383): 623-632.
- [14] 祁新, 王权, 顾德峰, 等. 马铃薯悬浮细胞培养[J]. 吉林农业大学学报(QI Xin, WANG Quan, GU De-feng, *et al.* Cell suspension culture of the potato[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*), 1996, 18(1): 21-24.
- [15] 张博. 拟南芥植株再生体系和悬浮细胞系的建立及超声生物学效应的研究[D]. 西安: 陕西师范大学(ZHANG Bo. Study on the Establishment of Regeneration System and Cell Suspension System and Biologic Effect of Ultrasound on *Arabidopsis thaliana*[D]. Xi'an: Shanxi Normal University), 2006. 17-27.
- [16] 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(ZHOU Ling-yan, QIN Hua-ming. Establishment of the suspension culture and regeneration system of carrot[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*), 2006, 34(16): 3929-3931.
- [17] 张立莹, 刘丽萍, 贾景明, 等. 东北红豆杉细胞悬浮培养研究[J]. 沈阳农业大学学报(ZHANG Li-ying, LIU Li-ping, JIA Jing-ming, *et al.* Study on cell suspension culture of *taxus cuspidata*[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*), 1997, 28(3): 180-185.
- [18] 李建安, 胡芳名, 谭晓风. 拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织对潮霉素的反应[J]. 中南林学院学报(LI Jian-an, HU Fang-

- ming, TAN Xiao-feng. Impact of hygromycin on *Arabidopsis* suspension cells and calli[J]. Journal of Central South Forestry University, 2006, 26(3): 42-46.
- [19] 王小军, 鲍文奎. 八倍体小黑麦耐盐细胞系产生的遗传机制[J]. 植物学报(WANG Xiao-jun, BAO Wen-kui. Genetic mechanism of the occurrence of salt tolerant variant of octoploid triticale under tissue and cell culture[J]. Acta Botanica Sinica), 1998, 40(4): 330-336.
- [20] 林定波, 颜秋生, 沈德绪. 柑橘抗寒细胞变异体的获得及其抗性遗传稳定性的研究[J]. 植物学报(LIN Ding-bo, YAN Qiu-sheng, SHEN De-xu. Selection of cold tolerant somaclonal variant from *citrus sinensis* cv. Jincheng and genetic stability evaluation of its cold tolerance[J]. Acta Botanica Sinica), 1999, 41(2): 136-141.
- [21] 祁新, 赵颖君, 王艳秋, 等. 马铃薯悬浮细胞原生质体培养及植株再生[J]. 吉林农业大学学报(QI Xin, ZHAO Ying-jun, WANG Yan-qiu, et al. Plant regeneration from the protoplasts of suspension cell culture of potato[J]. Journal of Jilin Agricultural University), 2000, 22(1): 52-55.
- [22] 贾勇炯, 陈放, 李瑛, 等. 从水稻悬浮细胞获得原生质体再生植株[J]. 四川大学学报(JIA Yong-jiong, CHEN Fang, LI Ying, et al. Plant regeneration from suspension culture cell-derived protoplasts in rice[J]. Journal of Sichuan University), 1994, 31(3): 382-385.
- [23] 刘璞, 孟令军, 张会霞, 等. cAMP 参与烟草悬浮细胞的 ABA 信号转导[J]. 植物学报(LIU Pu, MENG Ling-jun, ZHANG Hui-Xia, et al. Involvement of cAMP in ABA signal transduction in tobacco suspension cells[J]. Acta Botanica Sinica), 2002, 44(12): 1432-1437.
- [24] 费一楠, 张钊, 张飞雄. 烟草悬浮细胞细胞核及核骨架中存在有肌动蛋白和肌球蛋白的证据[J]. 首都师范大学学报(自然科学版)(FEI Yi-nan, ZHANG Zhao, ZHANG Fei-xiong. The evidence of β -actin and NM I β in the nuclei and nuclear matrix of the suspension cells of tobacco[J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)), 2008, 29(1): 55-60.
- [25] YUAN Hai-yong, YAO Lin-lin, JIA Zhi-qi, et al. *Verticillium dahliae* toxin induced alterations of cytoskeletons and nucleoli in *Arabidopsis thaliana* suspension cells[J]. Protoplasma, 2006, 229(1): 75-82.
- [26] BOUIZGARNE B, EI-MAAROUF-BOUTEAU H, FRANKART C, et al. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects[J]. New Phytologist, 2006, 169(1): 209-218.
- [27] DAVIES D R, BINDSCHEDLER L V, STRICKLAND T S, et al. Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57 (8): 1817-1827.
- [28] LEONE A, COSTA A, TUCCI M, et al. Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension cultures[J]. Plant Physiol, 1994, 106(2): 703-712.
- [29] LIM C J, YANG K A, HONG J K, et al. Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells[J]. J Plant Res, 2006, 119(4): 373-383.
- [30] VERGNOLLE C, VAULTIER M N, TACONNAT L, et al. The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions[J]. Plant Physiology, 2005, 139(3): 1217-1233.